

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## RECHERCHES SUR LA TENEUR COMPARATIVE EN BORE DE PLANTES CULTIVÉES SUR LE MÊME SOL

par GABRIEL BERTRAND et HERMANUS L. DE WAAL.

L'un de nous a fait intervenir autrefois les exigences quantitatives différentes des espèces végétales en certains éléments catalytiques : manganèse, zinc, bore, etc., comme la raison où, tout au moins, une des raisons qui ont conduit inconsciemment à la pratique des rotations culturales. Il a émis l'idée qu'il devait suffire de déterminer les proportions de ces éléments, spéciales à chaque espèce, puis de les ajouter au sol, pour se délivrer, s'il y avait profit, de la nécessité de ces rotations; enfin, il a fait observer que les doses à ajouter varient beaucoup avec les espèces et que l'on peut voir, par exemple, dans un même sol, le maïs résister davantage que l'avoine à l'élévation excessive de la proportion de bore (1).

Depuis, la question a fait des progrès. L'emploi du manganèse comme substance fertilisante est entré en usage et se répand de plus en plus. On commence aussi à se servir du zinc et du bore. C'est ainsi qu'avec ce dernier, répandu sous la forme d'acide borique ou de borate de sodium, non seulement on a

(1) G. BERTRAND, Sur le rôle des infiniment petits chimiques en agriculture. Conférence au VIII<sup>e</sup> Congrès international de Chimie appliquée. Washington et New-York, 1912. Reproduite dans ces *Annales*, 26, 1912, p. 852.

obtenu des augmentations de récoltes très marquées, parfois même surprenantes (1), mais qu'on peut lutter avec succès contre la maladie du cœur de la betterave, maladie qui, sans ce secours, deviendrait un nouveau fléau pour l'agriculture (2).

Mais il reste encore beaucoup à faire. En ce qui concerne particulièrement le bore, on n'a qu'une idée tout à fait insuffisante des besoins des plantes cultivées. On possède bien des déterminations de la teneur en bore de certains organes végétaux : graines, tubercules, feuilles, etc., mais il manque de résultats portant sur des plantes entières ou sur l'ensemble de leurs parties aériennes pour que l'on puisse se rendre compte des quantités de métalloïde enlevées à la terre arable par diverses récoltes.

Toutes ces raisons nous ont engagés à déterminer la teneur en bore d'une série de plantes cultivées les unes à côté des autres dans un même sol. Nous avons utilisé pour ce travail une partie des échantillons qui avaient été récoltés pour l'étude de l'absorption comparative, publiée antérieurement, du soufre, du phosphore (3) et de l'azote (4).

A tous les échantillons choisis, nous avons appliqué la méthode de dosage colorimétrique au curcuma (5), la seule qui permette d'évaluer le bore dans les plantes quand on ne dispose que d'une quantité réduite de substance analysable. En outre, lorsqu'il nous restait un poids de plantes assez grand, nous avons dosé aussi le métalloïde par la méthode volumétrique (6), toutefois, en opérant sur 5 à 10 grammes seulement de matières sèches et, à cause de cela, avec de l'eau de baryte diluée à environ N/11 pour le titrage final. L'eau de baryte était conservée à l'abri de l'acide carbonique de l'air dans le flacon-réservoir d'une burette à remplissage automatique. 1 cent. cube de réactif alcalin équivalait à 5 milligr. 75 d'acide borique  $B(OH)_3$ , soit à 1 milligr. 007 de bore (7).

(1) G. BERTRAND. *C. R. Ac. Agric.*, **21**, 1935, p. 983 et 1039.

(2) F. GUILBERT. *Bull. Assoc. Chim.*, **53**, 1936, p. 23.

(3) G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN. *C. R. Ac. Sc.*, **201**, 1935, p. 1449.

(4) G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN. *Ces Annales*, **57**, 1936, p. 79.

(5) G. BERTRAND et H. AGULHON. *Comptes rendus*, **157**, 1913, p. 1433 et *Bull. Soc. Chim.*, **15**, 4<sup>e</sup> sér., 1913, p. 197.

(6) G. BERTRAND et H. AGULHON. *Bull. Soc. Chim.*, **7**, 4<sup>e</sup> sér., 1910, p. 125.

(7) Pour employer ces méthodes, il faut se servir d'appareils en verre ne cédant pas de bore. Les nôtres étaient en verre d'Ina, aussi bon que le



La méthode volumétrique donne des résultats très exacts. Dans nos expériences, le titrage était sensible au 1/20 de centimètre cube, c'est-à-dire à 0 milligr. 05 de bore. Comme les opérations étaient effectuées sur 5 à 10 grammes de plantes sèches, on voit que l'approximation atteignait au moins 10 milligrammes de métalloïde par kilogramme.

La méthode colorimétrique est moins précise, mais encore très satisfaisante. Le tableau A donne les longueurs des bandes de papier de curcuma que l'on trouve colorées en rouge, après trois heures de séjour à l'étuve à  $+30^{\circ}$ , sous l'influence des quantités d'acide borique indiquées dans la deuxième colonne. Les chiffres de la troisième colonne sont ceux des quantités de bore correspondantes. On peut se rendre compte par l'inspection de ce tableau du degré d'approximation auquel il était possible de parvenir. A noter que les dosages ont porté sur des prises d'essais réduites, allant de 0 gr. 500 à 2 grammes.

TABLEAU A.

LONGUEUR des bandes colorées en rouge en milligrammes	BO <sup>3</sup> H <sup>3</sup> en milligrammes	BORE en milligrammes
Environ 1,5 . . . . .	0,0028	0,0005
— 2 . . . . .	0,0057	0,0010
— 3 . . . . .	0,0142	0,0025
— 4 . . . . .	0,0286	0,005
— 5 . . . . .	0,0400	0,007
— 6 . . . . .	0,0571	0,010
— 7 . . . . .	0,2857	0,050
— 8 . . . . .	0,4572	0,080
— 9 . . . . .	0,5714	0,100

Le tableau B rassemble les résultats de nos déterminations quantitatives exécutées sur 30 espèces végétales, la plupart de grande culture. Pour économiser la place, il n'est mentionné que les noms français de ces espèces. On trouvera les noms scientifiques latins ainsi que les teneurs en matières sèches dans la note des *Comptes rendus* rappelée plus haut (4). Presque toutes les déterminations ont été faites en double, avec ou sans

verre Cavalier, de Bohême, recommandé par les auteurs et que l'on n'a plus que difficilement dans le commerce.

TABLEAU B.

NOMS DES PLANTES	POIDS de matière sèche analysée en grammes	HONa	CENDRES p. 100 de matière sèche	MÉTHODE utilisée	EN MILLIGRAMMES par kilogramme de matière sèche	
					BO <sup>3</sup> H <sup>3</sup>	Bore
Orge . . . . .	2,08	+	—	Color.	14	Moy.
— . . . . .	1,13	—	7,8	—	12	2,3
Seigle . . . . .	1,61	—	8,9	Color.	18	Moy.
— . . . . .	1,74	+	—	—	17	3,1
Poireau . . . . .	1,00	—	9,0	Color.	14,2	Moy.
— . . . . .	1,00	—	—	—	21,4	3,1
Blé . . . . .	1,50	—	7,6	Color.	19,1	3,3
— . . . . .	1,50	+	—	—	19,1	—
Maïs . . . . .	1,00	—	8,0	Color.	28,6	5,0
— . . . . .	2,00	—	—	—	28,5	—
Epinard . . . . .	0,73	—	19,0	Color.	62	Moy.
— . . . . .	1,00	—	—	—	57	10,4
Morelle noire . . . . .	1,00	—	19,0	Color.	57,1	Moy.
— . . . . .	0,50	—	—	—	68,6	11,0
Chicorée . . . . .	1,00	—	11,5	Color.	100	Moy.
— . . . . .	1,00	—	—	—	57	13,1
Céleri . . . . .	1,00	—	20,2	Color.	100	0,050
Pois . . . . .	4,65	—	9,3	Volum.	124	21,7
— . . . . .	1,26	+	—	Color.	114	—
Moutarde blanche . . . . .	0,55	—	14,0	Color.	127	Moy.
— . . . . .	1,05	+	—	—	122	22,2
Plantain . . . . .	0,50	—	15,0	Color.	114,2	Moy.
— . . . . .	1,00	+	—	—	142,8	22,5
Carotte . . . . .	1,00	—	16,0	Color.	142,8	Moy.
— . . . . .	1,00	—	—	—	142,8	25,0
Tabac rustique . . . . .	1,00	—	21,7	Color.	142,8	25,0
Sainfoin . . . . .	1,00	—	7,2	Color.	214,2	Moy.
— . . . . .	0,50	+	—	—	200	36,2
Trèfle violet . . . . .	1,00	—	11,2	Color.	28,6	Moy.
— . . . . .	0,50	—	—	—	28,5	5,0
Chou . . . . .	1,00	—	17,0	Color.	214,2	Moy.
— . . . . .	1,354	—	—	—	211	37,1
Soja . . . . .	1,00	—	9,1	Color.	214,2	Moy.
— . . . . .	1,00	+	—	—	214,2	37,2
Lentille . . . . .	6,81	+	—	Volum.	237	41,4
— . . . . .	1,26	—	8,9	Color.	220	—
Haricot . . . . .	8,17	+	—	Volum.	246	43,0
— . . . . .	0,45	—	12,8	Color.	260	—
Cerfeuil . . . . .	1,11	—	12,6	Color.	243	Moy.
— . . . . .	0,43	+	—	—	279	45,5
Navet . . . . .	1,00	—	19,5	Color.	285,7	Moy.
— . . . . .	0,50	+	—	—	285,6	49,2
Moutarde noire . . . . .	8,48	—	12,3	Volum.	305	53,3
— . . . . .	1,17	+	—	Color.	212	—
Radis . . . . .	5,45	+	—	Volum.	369	64,5
— . . . . .	1,00	—	16,5	Color.	371,5	—
Mâche . . . . .	0,50	+	—	Color.	428,5	Moy.
— . . . . .	1,00	—	12,2	—	371,5	69,9
Trèfle incarnat . . . . .	7,18	+	—	Volum.	400	69,9
— . . . . .	0,58	—	10,0	Color.	350	—
Betterave . . . . .	6,64	+	—	Volum.	432,3	75,6
— . . . . .	0,50	—	17,4	Color.	428,5	—
Pissenlit . . . . .	1,00	—	13,0	Color.	457,2	80,0
Euphorbe . . . . .	4,324	+	—	Volum.	532	93,0
— . . . . .	0,45	—	14,4	Color.	471	—
Pavot . . . . .	5,31	+	16,0	Volum.	542	94,7
— . . . . .	0,50	—	—	Color.	571,4	—



addition de soude à la prise d'essai avant l'incinération. Cette particularité est indiquée dans la troisième colonne du tableau par les signes + et —. Il apparaît qu'avec les substances examinées, l'addition de soude n'a pas eu d'utilité appréciable. La sixième colonne donne les proportions d'acide borique trouvées et la septième les teneurs en bore qui leur correspondent  $[B(OH)_3 : 5,72 = B]$ . On voit que les résultats de la méthode colorimétrique et de la méthode volumétrique sont en aussi bon accord que possible. Pour faciliter les comparaisons entre les espèces végétales, les résultats sont rangés d'après la teneur croissante en bore et en donnant la préférence, lorsqu'il y a lieu, à ceux obtenus par la méthode volumétrique.

L'inégale disposition des espèces végétales à fixer le bore est frappante, puisqu'elle va de 2 milligr. 3 par kilogramme de matière sèche, dans le cas de l'orge, à 94 milligr. 7 dans celui du pavot ; c'est une variation de 1 à plus de 40.

Il semble exister une certaine relation entre la capacité de fixation du bore et la place des espèces dans l'échelle botanique. Il est remarquable, en tout cas, que les quatre graminées : l'orge, le seigle, le froment et le maïs, ne renferment que de 2 milligrammes à 5 milligrammes de bore par kilogramme. Ce sont les espèces les plus pauvres, avec le poireau, de la famille des Liliacées, autre Monocotylédone.

À côté de cela, les Légumineuses sont plutôt riches en bore, leur teneur étant généralement comprise entre 35 et 70 milligrammes par kilogramme de matière sèche. Il en est de même des Crucifères, des Ombellifères, de la mâche et du plantain.

Par contre, les 2 espèces de Chénopodées diffèrent beaucoup, l'épinard contient seulement une dizaine de milligrammes de métalloïde, tandis que la betterave en renferme plus de 75.

Enfin, ce sont l'euphorbe réveille-matin et le pavot qui sont les plus riches, avec des teneurs de plus de 90 milligrammes par kilogramme.

Il faudrait étendre ces résultats, rechercher ce qu'ils deviennent sous l'influence de sols de natures différentes, mais leur intérêt au point de vue physiologique et au point de vue agricole est déjà évident. C'est ainsi, par exemple, qu'ils permettent de mieux comprendre la facile intoxication de certaines plantes de grande culture, en particulier de céréales, par des

engrais naturellement riches en bore, comme cela s'est produit il y a une quinzaine d'années aux États-Unis, ou bien, au contraire, l'affaiblissement de la résistance de la betterave à la maladie du cœur quand cette espèce, relativement riche en bore, est cultivée dans un sol n'ayant reçu que des engrais industriels à peu près complètement dépourvus de ce métalloïde.

# ACTION THÉRAPEUTIQUE DE L'INJECTION SOUS-CUTANÉE D'EAU CONTRE LES ACCIDENTS DUS AUX VENINS (1)

par ÉTIENNE SERGENT.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

## I. — VENIN DE VIPÈRE.

*Cerastes cornutus* L. et *Cerastes cornutus* var. *mutila* Nob.

Les expériences ont été faites avec du venin de vipère à cornes de l'Afrique du Nord conservé desséché, redissous au moment de l'emploi et injecté sous la peau à des souris blanches.

La dose minima mortelle pour une souris de 20 grammes est de 0 gr. 00016 de venin sec dissous dans V gouttes d'eau salée à 9 grammes de NaCl par litre. Nous vérifions qu'une souris de 20 grammes supporte sans dommage l'injection sous-cutanée de XX gouttes d'eau salée.

On injecte sous la peau de 577 souris une dose, mortelle en deux heures, de venin de vipère à cornes. On partage les souris en 4 lots dont le premier sert de témoin; les 3 autres lots sont traités.

Nous disons que la mort est *retardée* quand elle survient après la mort des témoins (retard de quelques heures ou de quelques jours). Nous disons qu'il y a *survie* quand les souris sont parfaitement bien portantes plus de huit jours après l'injection de venin.

Les trois lots traités reçoivent, dans les minutes qui suivent l'injection de venin et en un point différent du corps de la souris :

Le deuxième lot : X gouttes de sérum AN, sérum préparé

(1) Un mémoire détaillé paraîtra dans les *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 14, 1936.



avec le venin des serpents d'Afrique du Nord, surtout des vipéridés : céraistes, lébétines, avec un peu de venin de colubridés.

Le troisième lot : X gouttes de sérum ER, sérum préparé avec le venin de vipéridés d'Europe.

Le quatrième lot : X gouttes d'eau salée.

Les 174 souris témoins non traitées meurent toutes dans un délai moyen de deux heures. Mortalité : 100 p. 100.

Sur 151 souris qui reçoivent du sérum AN, 39 p. 100 survivent, 56 p. 100 ont une mort retardée, 5 p. 100 meurent comme les témoins.

Sur les 101 souris qui reçoivent du sérum ER, 34 p. 100 sur-

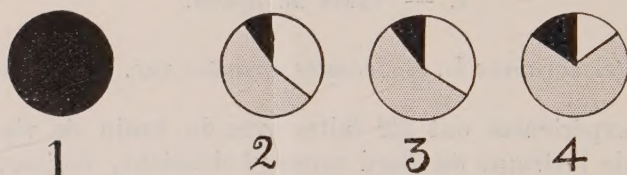


FIG. 1. — Souris à qui on injecte du venin de vipère à cornes. Secteur blanc, survie ; secteur gris, mort retardée ; secteur noir, mort rapide comme les témoins.

1, souris témoins ; 2, souris relevant sous la peau, après l'injection de venin, du sérum antivenimeux AN ; 3, souris recevant sous la peau, après l'injection de venin, du sérum antivenimeux ER ; 4, souris recevant sous la peau, après l'injection de venin, de l'eau salée.

vivent, 56 p. 100 ont une mort retardée et 10 p. 100 meurent comme les témoins.

Sur les 151 souris qui reçoivent de l'eau, 16, 5 p. 100 survivent, 67 p. 100 ont une mort retardée, 16, 5 p. 100 meurent comme les témoins (fig. 1).

En résumé, l'épreuve est très sévère puisque le sérum AN spécifique, préparé contre le venin des vipères de l'Afrique du Nord, ne sauve définitivement que 39 p. 100 des souris. Comme on pouvait s'y attendre, le sérum ER préparé contre le venin des vipères d'Europe se montre un peu moins actif que le sérum AN. Le point nouveau que montrent ces expériences est le résultat obtenu avec l'injection sous-cutanée d'eau : tandis que le sérum spécifique sauve définitivement 2 sujets sur 5, l'injection d'eau en sauve presque 1 sur 5.



## II. — VENIN DE SCORPION.

La même expérience a été faite avec du venin des scorpions de l'Afrique du Nord : *Buthus occitanus* Amrx et *Prionurus australis* L.

On injecte sous la peau de 602 souris une dose mortelle en deux heures de venin de scorpion.

Les 398 souris traitées reçoivent sous la peau X à XX gouttes d'un liquide (eau, eau salée, sérums de couleuvre, de grenouille,

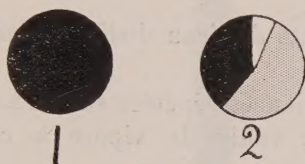


FIG. 2 — Souris à qui on injecte du venin de scorpion. Secteur blanc, survie; secteur gris, mort retardée; secteur noir, mort rapide comme les témoins.

1, souris témoins; 2, souris recevant sous la peau, après l'injection de venin, de X à XX gouttes d'un liquide.

eau contenant diverses substances organiques, etc.) avant, pendant et après l'injection de venin.

Les 204 souris témoins meurent toutes dans un délai moyen de deux heures. Mortalité : 100 p. 100.

Sur les 398 souris qui reçoivent de X à XX gouttes de liquide 8 p. 100 survivent, 56 p. 100 ont une mort retardée, 35, 9 p. 100 meurent comme les témoins (fig. 2).

\*  
\* \*

En résumé, des expériences qui ont porté sur 927 souris ont donné des résultats à peu près semblables, qu'elles aient été faites avec du venin de vipère à cornes ou avec du venin de scorpion. Tous les témoins, au nombre de 378, meurent en deux heures; au contraire, les souris injectées de venin qui reçoivent sous la peau un liquide autre qu'un sérum thérapeutique survivent définitivement dans la proportion de 10,3 p. 100 (37 sur 549), ou ont leur mort retardée dans la proportion de 59,4 p. 100 (325 sur 549), 30,4 p. 100 (167 sur 549) meurent comme les témoins.

## III. — MODE D'ACTION DE L'EAU INJECTÉE SOUS LA PEAU.

1<sup>o</sup> Nous avons voulu voir si l'action empêchante était due au chlorure de sodium ou à l'eau elle-même.

On injecte à 65 souris une dose mortelle de venin de scorpion, puis 31 souris reçoivent X gouttes de solution de NaCl à 5 p. 100, et 34 souris X gouttes d'eau distillée. Les résultats ont été à peu près les mêmes dans les deux cas :

Action empêchante du chlorure de sodium : chez 26 souris sur 31 ;

Action empêchante de l'eau distillée seule : chez 30 souris sur 34.

Les mêmes expériences répétées sur 138 souris recevant des doses mortelles de venin de vipère à cornes donnent les mêmes résultats :

Les injections d'eau distillée agissent à peu près comme celles d'eau salée à 9 p. 1000.

Les solutions salées hypertoniques agissent moins bien. Du sérum normal de cheval n'agit pas mieux que l'eau salée.

Il y a donc lieu de croire que, dans ces expériences, c'est l'injection d'une masse liquide qui agit.

2<sup>o</sup> On peut se demander si l'eau agit en diluant simplement le venin avant qu'il ait eu le temps d'imprégner les cellules de l'organisme. On sait, en effet, que l'action d'un venin est proportionnelle à sa quantité.

678 souris de 18 à 20 grammes reçoivent une dose mortelle de venin de vipère et sont partagées en six lots.

Les cinq premiers lots, de 113 souris chacun, reçoivent la même dose mortelle de venin de céraste dissous dans des quantités croissantes d'eau salée :

Lot I, D. M. +	II gouttes d'eau.
Lot II, D. M. +	IV gouttes d'eau.
Lot III, D. M. +	VIII gouttes d'eau.
Lot IV, D. M. +	XVI gouttes d'eau.
Lot V, D. M. +	XXXII gouttes d'eau.

D'autre part, le sixième lot, de 113 souris également, reçoit la même dose mortelle et, quelques minutes plus tard, en un autre point du corps, X gouttes d'eau salée sous la peau.



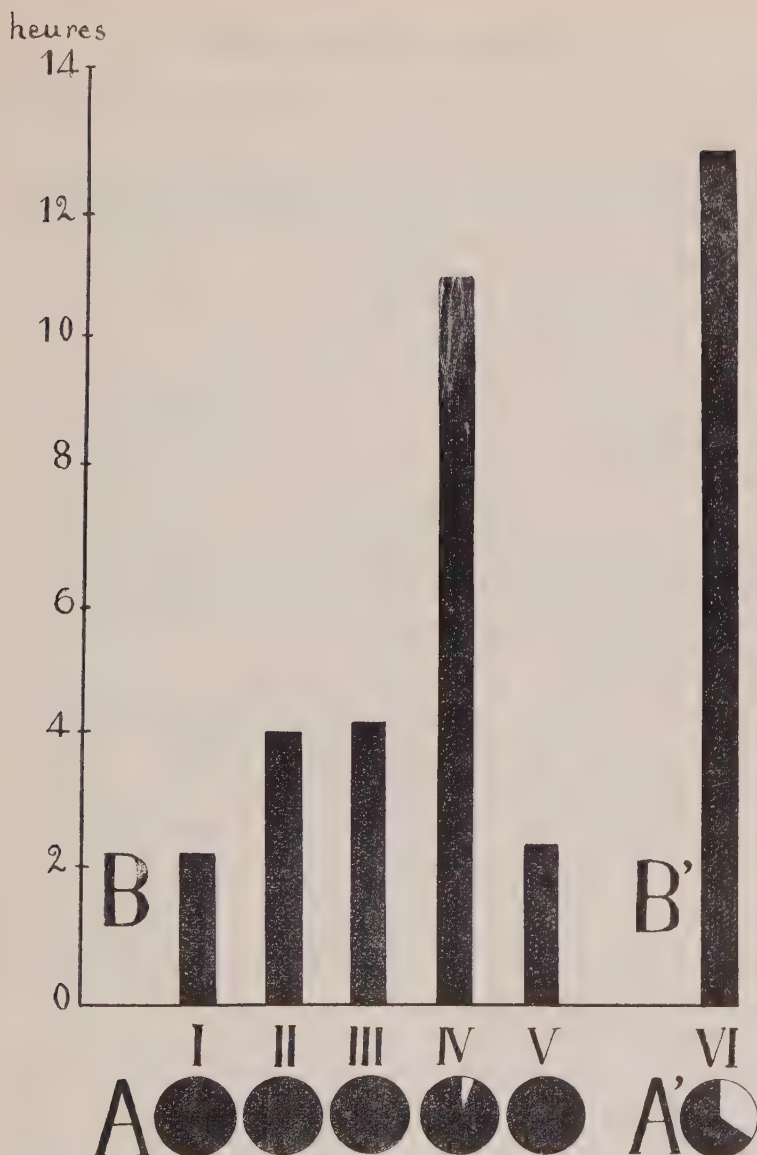


Fig. 3. — Souris à qui on injecte du venin de vipère dilué dans l'eau, ou bien du venin de vipère, puis de l'eau.

AA', *survie ou mort rapide*, après injection de : A (I, II, III, IV, V) venin dilué; A' (VI) venin pur, puis eau. *Survie*, secteur blanc. *Mort rapide*, secteur noir.

BB', *mort retardée*, après injection de : B (I, II, III, IV, V) venin dilué; B' (VI) venin pur, puis eau.

La hauteur de la colonne est proportionnelle à la durée du retard.

N° I, on injecte une dose mortelle diluée dans II gouttes d'eau; n° II, on injecte une dose mortelle diluée dans IV gouttes d'eau; n° III, on injecte une dose mortelle diluée dans VIII gouttes d'eau; n° IV, on injecte une dose mortelle diluée dans XVI gouttes d'eau; n° V, on injecte une dose mortelle diluée dans XXXII gouttes d'eau; n° VI, on injecte une dose mortelle de venin, puis X gouttes d'eau en un autre point du corps.

Les résultats de cette expérience donnent lieu à trois sortes d'observations :

a) Dans les quatre premiers lots qui ont reçu des dilutions d'une même dose de venin dans des quantités croissantes d'eau (de II à XVI gouttes), le nombre des heures de survie est en raison directe du taux de la dilution de ce venin dans l'eau salée. La moyenne des heures de survie est de plus en plus élevée à mesure que la dilution a été plus forte :

II gouttes . . . . .	2 heures $\frac{1}{4}$ .
IV gouttes . . . . .	4 heures.
VIII gouttes . . . . .	4 heures $\frac{1}{4}$ .
XVI gouttes . . . . .	11 heures $\frac{1}{4}$ .

b) Avec une dose de XXXII gouttes au contraire, la durée de la survie n'a pas été beaucoup plus élevée qu'avec II gouttes : deux heures et demie. Un volume de XXXII gouttes d'eau ajouté au venin est sans doute intolérable pour une souris de 18 à 20 grammes.

c) Si l'on compare le sort des souris ayant reçu du venin dilué avant l'injection à celui des souris qui reçoivent du venin pur, puis de l'eau sous la peau, on constate ceci :

Sur les 565 souris des cinq premiers lots qui ont reçu du venin dilué, 5 seulement ont survécu (0,8 p. 100) tandis que, sur les 113 souris du sixième lot qui ont reçu d'abord le venin puis de l'eau en un autre point du corps, 31 survivent, soit 27,4 p. 100 ; et chez celles qui sont mortes, le nombre d'heures de survie est plus élevé que dans les cinq premiers lots : treize heures en moyenne (fig. 3).

*L'action de l'eau salée est donc plus forte lorsqu'elle est injectée après le venin que lorsqu'elle est mélangée au venin avant l'injection.*

On sait qu'un sérum spécifique, au contraire, est plus actif quand il est mélangé au venin *avant* qu'on injecte ce dernier que lorsqu'il est injecté *après* le venin : « Si l'on injecte, dit A. Calmette (1), aux animaux le venin d'abord, aux doses calculées pour tuer les témoins de même poids en deux ou trois heures, et le sérum quinze minutes après, on constate que la quantité de sérum qu'on doit injecter pour empêcher

(1) A. CALMETTE. *Les venins*, 1907, Masson, éditeur, p. 280.



la mort est environ trois fois plus grande que celle qui neutralise *in vitro* la dose de venin inoculée ».

L'eau injectée sous la peau n'agit donc pas simplement en diluant le venin, qu'il s'agisse de venin de vipère ou de venin de scorpion.

\*  
\* \*

En résumé, dans des expériences dont les conditions sont sévères puisqu'un sérum antivenimeux spécifique ne sauve pas la totalité des souris ayant reçu une dose mortelle, l'injection sous-cutanée d'eau pratiquée après l'injection de venin de vipère ou de scorpion se montre efficace dans une forte proportion de cas.

Des conclusions pratiques de deux sortes peuvent être tirées de ces faits : 1° si l'on manque d'un sérum spécifique pour le traitement d'hommes ou d'animaux domestiques mordus ou piqués par des animaux venimeux, il est indiqué de recourir à des injections sous-cutanées massives d'eau salée à 9 p. 1000 (ou, à défaut, de sérums quelconques).

2° Il est indiqué d'employer, pour l'hyperimmunisation des animaux destinés à fournir des sérums thérapeutiques, des solutions étendues de venin.

## ALLERGIE TUBERCULEUSE ET ANAPHYLAXIE

par E. CARLINFANTI.

(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)

Depuis la découverte de la sensibilité des sujets tuberculeux à la tuberculine, les interprétations qui ont été données de ce phénomène sont nombreuses et variées. Koch émit d'abord l'idée de l'*addition* de la tuberculine injectée à celle qui existait déjà dans l'organisme infecté; puis d'autres interprétations furent proposées au fur et à mesure de l'évolution des conceptions immunologiques: la découverte des anticorps fixateurs de l'alexine vis-à-vis des antigènes tuberculeux conduisit à l'hypothèse d'une *antituberculine* qui fixerait la tuberculine *in vivo* en formant un complexe nocif; Maurice Nicolle admit l'existence d'une *lysine* spéciale qui décomposerait la tuberculine et provoquerait la formation de substances toxiques. Les études sur la sensibilisation aux protéines hétérologues, à la suite des découvertes de Ch. Richet et de M. Arthus, ont permis de rapprocher la sensibilité tuberculinique de la sensibilité exprimée par les réactions anaphylactiques. Ce rapprochement est fondé sur plusieurs analogies, notamment sur l'existence d'une période d'incubation après l'injection de l'antigène préparant; la nécessité, dans les deux cas, d'introduire la dose déchaînante par voie parentérale; la possibilité de provoquer des accidents généraux et des accidents locaux, selon la voie de l'injection déchaînante. Frappé de cette similitude, Pirquet donna au phénomène de la sensibilité tuberculinique le nom d'*allergie* en le considérant comme un cas particulier de l'anaphylaxie.

Cette conception servit de point de départ aux recherches sur l'analogie entre l'anaphylaxie sérique d'une part, et l'allergie tuberculinique d'autre part, recherches qui, nous le verrons, n'ont pas abouti à l'identification des deux phénomènes.



\*  
\* \*

Plusieurs auteurs ont considéré le choc tuberculinique comme un phénomène trop complexe pour permettre l'étude du mécanisme de l'allergie. En effet, dans ce phénomène, l'action de la tuberculine sur les tissus sensibles ne jouerait un rôle important que durant la première phase ; dans les phases suivantes, il se produirait une intoxication due aux substances mises en liberté par les foyers tuberculeux réveillés. Cette intoxication se traduirait par des symptômes graves, susceptibles d'entraîner la mort.

Les recherches se sont donc orientées vers l'étude de l'intra-dermo-réaction de Mantoux considérée comme l'expression la plus pure de l'allergie permettant de suivre le développement de la sensibilité et de préciser le déterminisme des phénomènes allergiques.

Dans ce mémoire, nous reprendrons l'étude du problème des analogies entre l'allergie tuberculeuse et l'anaphylaxie sous leurs divers aspects, en utilisant, comme épreuves, l'intra-dermo-réaction de Mantoux d'une part, et les réactions locales d'anaphylaxie provoquées par des injections intradermiques de protéines étrangères chez des animaux préalablement sensibilisés, d'autre part.

En premier lieu, nous examinerons les antigènes et leurs propriétés, l'importance de la dose sensibilisante et son influence sur la période qui précède le début de la sensibilité (période préanaphylactique, période préallergique ou antéallergique) ; puis nous examinerons les caractères des réactions et leur spécificité ; enfin, nous envisagerons la possibilité d'une désensibilisation et d'une transmission passive de la réactivité locale anaphylactique et allergique.

#### LES ANTIGÈNES.

Les antigènes employés en vue de déterminer une sensibilité anaphylactique traduite par des localisations sont très nombreux.

Chez les cobayes, le sérum de cheval, la globuline sérique,

le blanc d'œuf, l'ovoglobuline ont été employés avec succès. Chez le lapin, on a pu provoquer le phénomène d'Arthus par les sérums hétérologues, par le blanc d'œuf, par la gélatine. Les protéines de structure simple, comme la globine (Poletti), et même les premiers produits de la désintégration des protéines (peptones) seraient capables de produire une véritable sensibilisation.

La sensibilité à la tuberculine constitue un caractère de l'infection bacillaire. Mais l'état allergique peut être déterminé par injection de bacilles peu pathogènes, comme la souche R<sub>1</sub> de Trudeau, de bacilles définitivement atténués comme le BCG (A. Boquet et L. Nègre), ou même de bacilles morts (Borrel, Krompecher, A. Boquet et L. Nègre, Petroff et Zinsser). Selon A. Boquet et J. Bretey, la dose minima sensibilisante de bacilles tués par chauffage à 120° est d'environ 0 milligr. 01 à 0 milligr. 1 par la voie péritonéale chez le cobaye.

La réaction dermique à la tuberculine devient positive du dixième au quinzième jour et persiste au minimum pendant trois mois.

On n'a jamais pu provoquer chez l'animal sain, par l'introduction, même répétée, de tuberculine, un état de sensibilité net et durable. Toutefois, les mélanges de sérum de porc et de tuberculine (F. de Groer, S. Progulski et Redlich) ou de tuberculine et sérum de cheval, et même de tuberculine et d'humeur aqueuse (H. S. Reichle et H. Goldblatt) sensibiliseraient les cobayes à la tuberculine. La tuberculine dépourvue de propriétés antigènes *in vivo* se comporterait donc comme un haptène de Landsteiner ou comme un antigène passif de Maurice Nicolle.

D'autre part, la nature chimique de la substance active contenue dans la tuberculine n'est pas encore exactement connue. Au cours de ces dernières années, F. Seibert a isolé un protéide bacillaire qui serait doué d'activité tuberculinique et de pouvoir sensibilisant. A. Boquet et G. Sándor ont constaté qu'on peut, en effet, provoquer, chez le cobaye sensibilisé par les protéides des bacilles de Koch ou par les protéides des cultures de ce germe, des réactions au même antigène; mais les réactions que ces expérimentateurs ont observées étaient constamment du type anaphylac-



tique, jamais elles ne présentaient les caractères des réactions allergiques.

Quelques expériences, effectuées par nous-même sur le lapin nous ont donné des résultats semblables, bien que cet animal se soit montré un réactif moins sensible que le cobaye.

Le problème consistant à provoquer une sensibilité de type allergique par des produits bacillaires chimiquement définis n'est donc pas résolu.

#### DOSE SENSIBILISANTE ET PÉRIODE ANTÉALLERGIQUE.

La sensibilité tuberculinique cutanée est d'autant plus vive et d'autant plus précoce que la dose infectante a été plus forte.

Dans l'anaphylaxie, au contraire, on admet généralement que la période d'incubation varie inversement à la dose sensibilisante : avec des doses minimales d'antigènes (0 c. c. 000001 de sérum de cheval), Rosenau et Anderson ont pu réduire l'incubation à sept jours. Il est intéressant de noter que ce contraste disparaît quand on envisage les manifestations locales de l'anaphylaxie. En effet, soit chez le lapin, soit chez le cobaye, on n'observe pas ce rapport inverse entre la dose sensibilisante d'une part, le degré et la précocité de la sensibilité dermique d'autre part. Des doses considérables d'antigène sont même nécessaires pour obtenir une sensibilité intense et précoce.

La voie de la sensibilisation semble avoir aussi une certaine importance : en particulier chez le lapin, la voie intraveineuse semble être plus efficace dans la production de l'allergie (A. Boquet et L. Nègre) comme dans l'anaphylaxie locale (Carlinfanti et Galli).

L'enrobage dans la paraffine ou l'huile de vaseline produit un accroissement du pouvoir allergisant des bacilles morts : la période antéallergique est raccourcie et l'intensité de la réaction se trouve augmentée (E. Coulaud, A. Saenz).

Nous rappelons encore que la période antéallergique est d'autant plus courte que la virulence des germes est plus grande ; elle atteint sa durée maximum dans le cas de sensibilisation par des bacilles morts (A. Boquet et J. Bretey).

## CARACTÈRES DES RÉACTIONS.

Les réactions anaphylactiques et les réactions allergiques constituent deux types bien distincts parmi les phénomènes inflammatoires aseptiques.

Ce fut Zinsser qui, le premier, en 1921, opposa le type anaphylactique des réactions cutanées d'hypersensibilité immédiates et transitoires, au type tuberculinique, où les réactions sont tardives et prolongées.

Ensuite, Dienes et Mallory et R. Laporte poursuivirent l'étude de la question en apportant des connaissances nouvelles très importantes. Les réactions anaphylactiques de la peau se distinguent des réactions tuberculeuses, selon Laporte, par leur précocité, l'importance de la nécrose vasculaire et des hémorragies capillaires, l'abondance de l'œdème, la rareté relative des cellules inflammatoires, la prédominance des polynucléaires et l'accumulation des éosinophiles; mais elles aboutissent également à la production d'un tissu de granulation. « Le phénomène complexe que représentent toutes les réactions locales d'hypersensibilité, allergiques et anaphylactiques, évolue donc suivant un double processus : un processus primaire et principal, essentiellement exsudatif et dégénératif, caractérisé par une nécrose locale, accompagné d'œdème fibrineux et d'une émigration cellulaire massive; un processus secondaire et tardif de résorption par le mésenchyme des résidus de l'inflammation aiguë. Ce processus prolifératif aboutit à la formation d'un tissu tuberculoïde contenant des cellules épithélioïdes, des cellules géantes et des cellules rondes » (Laporte).

En 1928, Dienes, avec Schœnheit et Simon, entreprit une longue série de recherches en vue d'étudier la possibilité de provoquer des réactions du type tuberculinique par des injections de protéines animales. Le savant américain est arrivé aujourd'hui à une conception personnelle fort intéressante des phénomènes d'allergie :

« Le processus de sensibilisation ne débiterait pas par la production d'anticorps et leur diffusion dans les tissus et dans les humeurs, mais par une période d'hypersensibilité pure-

ment tissulaire, dont le développement précéderait de plusieurs jours la production d'anticorps circulants. Quatre jours après l'injection de quelques milligrammes de blanc d'œuf, les cobayes donnent déjà une réaction faible, mais nettement positive, alors que la sensibilité anaphylactique et les anticorps ne font pas leur apparition avant le huitième jour. Des observations semblables ont été faites chez le lapin et chez l'homme. Ces réactions faibles diffèrent considérablement des réactions qu'on obtient au bout de quelques semaines et des réactions des animaux sensibilisés passivement. Les premières sont tardives et persistantes; elles ressemblent, sous tous leurs aspects, aux réactions faibles à la tuberculine et contrastent avec l'œdème immédiat qui caractérise les réactions transmises passivement. »

Si on sensibilise des cobayes tuberculeux avec du blanc d'œuf, les réactions ci-dessus décrites sont remplacées, vers la fin de la semaine suivante, par des réactions nécrotiques intenses qui présentent tous les caractères (même histologiques) des réactions cutanées à la tuberculine (caractère tardif, impossibilité de la transmission passive, etc.). La méthode la plus efficace pour produire une forte sensibilité du type tuberculinique consiste à injecter le blanc d'œuf dans la lésion tuberculeuse.

Dienes fut d'abord conduit à attribuer au tissu tuberculeux un rôle très important dans la genèse de ce type de sensibilité, puis il affirma que, contrairement à sa supposition, « le tissu tuberculeux n'est pas directement responsable de la production des anticorps et de la sensibilité. La réponse de l'organisme n'est pas un processus local : l'antigène quitte la lésion et les anticorps sont produits ailleurs ».

La sensibilisation anaphylactique des cobayes tuberculeux fut également effectuée par M<sup>me</sup> Gaiginski qui observa, exceptionnellement, des réactions tardives chez des animaux tuberculeux sensibilisés par trois ou quatre injections de blanc d'œuf.

Dans le dessein d'étudier les problèmes posés par les expériences de Dienes, nous avons entrepris une série de recherches. Nous avons d'abord essayé de provoquer la sensibilité du type tuberculinique, en injectant du sérum de cheval dans le foyer tuberculeux. Nous n'avons jamais eu de résultats positifs : les



réactions étaient constamment du type anaphylactique comme chez les témoins non tuberculeux. Voici une de nos expériences :

14 cobayes tuberculisés depuis deux mois par inoculation dans la cuisse de 0 milligr. 001 de bacilles bovins virulents (souche Vallée) reçoivent dans les ganglions inguinaux tuberculeux ou dans leur voisinage 1 cent. cube de sérum de cheval.

14 cobayes sains reçoivent le même jour 1 cent. cube de sérum de cheval dans le tissu sous-cutané de la cuisse.

Les cinquième, dixième et quinzième jours, tous les cobayes sont

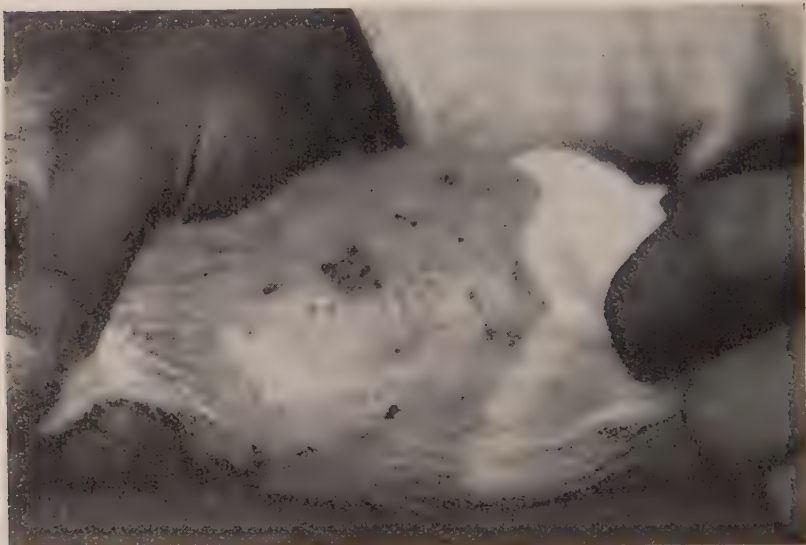


FIG. 1. — Réaction anaphylactique de deux heures chez le cobaye. Grosse papule centrée par une tache hémorragique (photographie P. Jeantet).

éprouvés par voie dermique (0 c. c. 1 de sérum). Ils réagissent tous par des réactions d'intensité progressivement croissantes jusqu'à donner, au quinzième jour, des réactions caractérisées par une large papule, centrée par une aire hémorragique et souvent nécrotique; mais ces lésions, même chez les cobayes tuberculeux, débutent quelques minutes après l'injection et atteignent leur maximum vers la cinquième ou la sixième heure.

Ensuite, nous avons sensibilisé avec du sérum de cheval, par voie extrafocale, des cobayes infectés soit avec des bacilles de la souche bovine Vallée, soit avec des bacilles peu virulents de la souche R<sub>1</sub> de Trudeau, et, parallèlement, des cobayes non infectés.

Sur plusieurs lots de cobayes que nous avons préparés dans l'expérience relatée ci-dessus, nous n'avons constaté de réactions appartenant nettement au type tuberculinique que chez 2 cobayes tuberculisés par des bacilles bovins et chez 2 cobayes infectés par la souche  $R_1$ .

14 cobayes infectés depuis un mois par inoculation intrapéritonéale de 5 centigrammes de bacilles  $R_1$ , 12 cobayes tuberculisés depuis un mois par

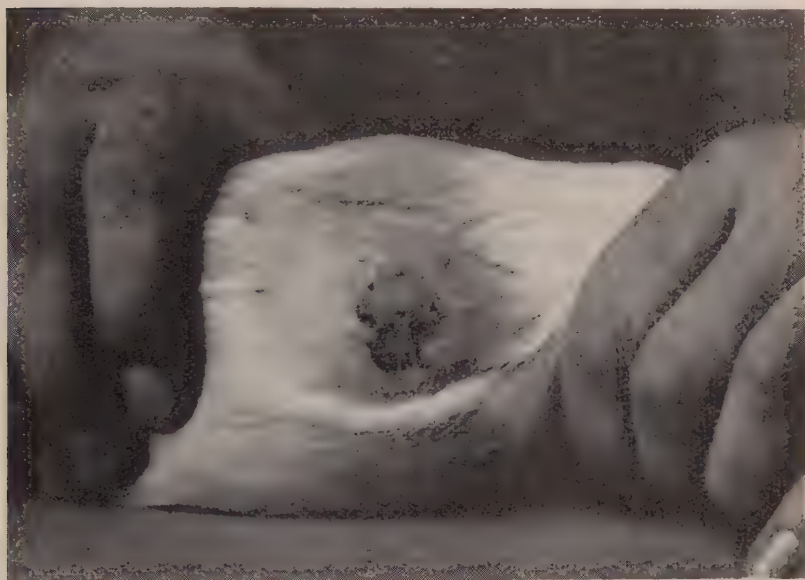


FIG. 2. — Réaction au sérum de cheval du type tuberculinique chez un cobaye tuberculeux (trente-six heures après l'injection). Papule avec vaste zone nécrotique centrale (photographie P. Jeantet).

inoculation intrapéritonéale de 0 milligr. 001 de bacilles bovins (souche Vallée), et 10 cobayes neufs reçoivent 1 cent. cube de sérum de cheval dans le tissu sous-cutané de la cuisse.

Tous ces animaux sont éprouvés le troisième et le cinquième jour par injection intradermique de 0 c. c. 1 de sérum de cheval. Ils ne présentent aucune réaction.

Le huitième jour, une nouvelle épreuve donne les résultats suivants :

*Cobayes infectés par  $R_1$ .* — Réaction papuleuse précoce chez 8 cobayes. Après quinze heures, deux autres cobayes montrent une réaction très intense, caractérisée par une large papule et une infiltration du derme qui s'étendent au tissu sous-cutané sur une aire de 3 centimètres de diamètre. Cette papule est centrée par une large tache congestive qui devient nécrotique au bout de trente-six heures.

*Cobayes tuberculisés par des bacilles bovins.* — Chez 10, papule précoce. Chez deux autres cobayes, on observe des réactions tardives, nécrotiques, tout à fait semblables à celles observées chez les 2 cobayes du lot précédent (voir fig. 3).

*Cobayes sains.* — Papules précoces chez tous, accompagnées chez 3 d'une tache hémorragique centrale.

Tous les cobayes des trois lots sont ensuite soumis à une série de dix injections quotidiennes de 1 cent. cube de sérum de cheval par voie sous-cutanée. Le lendemain de la dernière injection, ils sont éprouvés par voie dermique. Ils présentent tous une réaction précoce papuleuse, centrée, chez la plupart, par une aire de nécrose.

Il est intéressant de noter que la sensibilité du type tuberculinique au sérum de cheval disparaît après une série d'injections répétées chaque jour de cet antigène, en donnant lieu au type commun de sensibilité anaphylactique.

L'état de sensibilité allergique est donc, suivant l'expression de Dienes, un état temporaire et instable.

Il résulte en outre de nos expériences que, parmi les facteurs qui déterminent le type particulier de sensibilité, on doit considérer aussi les propriétés individuelles qui interviennent dans la réponse de l'organisme à l'antigène.

Nous devons encore rappeler que, comme l'a montré P. Rondoni, tous les tissus des tuberculeux ne participent pas à l'hypersensibilité tuberculinique; lorsque le cœur d'un cobaye tuberculeux indemne de lésions spécifiques est soumis à la circulation artificielle dans un liquide contenant de la tuberculine, il se comporte comme le cœur d'un cobaye sain. La moelle osseuse des cobayes tuberculeux cultivée *in vitro* se montre insensible à l'action de la tuberculine (Carlinfanti). De même, chez les animaux anaphylactisés, tous les tissus ne réagissent pas au contact de l'antigène (Scholer, Klinge).

Récemment nous avons décrit, en collaboration avec Scalfi, des réactions pulmonaires infiltratives et hémorragiques, qui font suite à l'injection intraveineuse de sérum de cheval chez le lapin sensibilisé par le même sérum. Or, cette réaction ne débute que vingt-quatre heures après l'injection déchaînante, et atteint son acmé vers la quarante-huitième ou la soixantedouzième heure. La transmission passive de cette sensibilité n'a pu être effectuée.

Donc cette réaction, tout en se manifestant dans les conditions qui provoquent des phénomènes anaphylactiques en d'autres



tissus, s'éloigne, par ses caractères, des réactions anaphylactiques typiques en se rapprochant des phénomènes de type allergique.

Ainsi, au fur et à mesure que les études des réactions anaphylactiques et allergiques locales se poursuivent, de nombreux points de passage sont mis en évidence, permettant de penser que les caractères différentiels qui séparent ces deux ordres de phénomènes ne sont pas si nets et si absolus qu'on le supposait jusqu'à ces derniers temps.

#### REVIVISCENCE DES RÉACTIONS.

Un autre caractère classique de la sensibilité tuberculinique que nous avons constamment observé, est la reviviscence qui survient lors de l'administration de tuberculine dans un autre endroit quelconque de l'organisme (*Aufflammungsreaktion*).

Nous avons aussi constaté très souvent des réactions de reviviscence dans l'anaphylaxie sérique du cobaye : une réaction, même faible, consécutive à une injection intradermique d'épreuve, peut être réactivée par une ou plusieurs autres injections ultérieures du même antigène.

En outre, la réaction minime, même invisible, consécutive à l'injection intradermique d'antigène effectuée au cours de la période préanaphylactique (vers le troisième jour après l'injection préparante), peut être réactivée quelques jours plus tard par une autre injection sous-cutanée ou intrapéritonéale du même antigène. L'aire cutanée intéressée devient hyperémique après la première injection déchaînante faite vers le dixième jour; si l'on répète cette injection déchaînante quelques jours plus tard, cette reviviscence aboutit à la nécrose (fig. 3).

#### SPÉCIFICITÉ.

Il est connu depuis longtemps que l'état allergique des tuberculeux n'est pas rigoureusement spécifique. Le sujet tuberculeux réagit parfois à des produits microbiens divers; des réactions locales peuvent être déclenchées chez le cobaye tuberculeux par l'inoculation intradermique de malléine (Borrel), d'extraits de bacilles paratuberculeux divers (B. Lange

et F. Lange, A. Boquet et L. Nègre, E. Alexa), de cultures de *B. coli* (Selter, P. Bordet), ou d'extraits de *Nocardia* et de Streptothricées (Breley), ou de streptocoques (Antoniarzi), etc.

Les expériences de P. Bordet ont montré que l'injection de BCG provoque chez le cobaye un état de sensibilité remarquable à l'injection intrapéritonéale de *B. coli* tués par chauffage; cette hypersensibilité, qui se manifeste par la mort de l'animal au bout de six heures, apparaît dix jours après l'infection. De

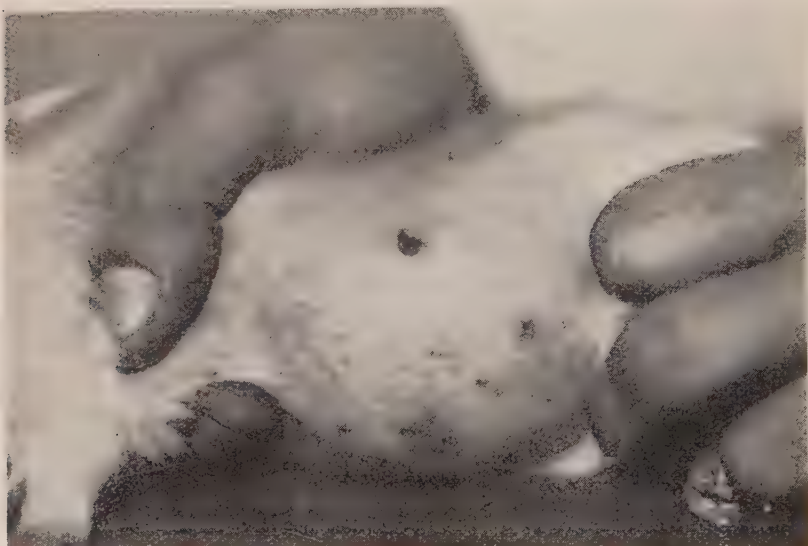


FIG. 3. — Réaction de reviviscence à l'endroit d'une injection préanaphylactique de sérum chez un cobaye. Escarre nécrotique entourée d'un halo hyperémique (photographie P. Jeantet).

même, les cobayes sensibilisés par le BCG réagissent par une réaction hémorragique et nécrotique à l'injection sous-cutanée de *B. coli*. Il s'agit ici, d'après P. Bordet, d'un état d'allergie hémorragique tout à fait comparable au phénomène obtenu en 1924 par Sanarelli, par l'injection de *B. coli* chez des lapins infectés vingt-quatre heures auparavant par une dose infamortelle de Vibrions cholériques, et à la variété locale de ce phénomène observé par Schwartzman.

La réactivité de l'organisme se manifeste même à l'égard de stimulants divers de nature physique et surtout chimique, qui

sont tout à fait dépourvus d'activité chez les sujets sains (Micheli, Bastai, Di Pietre).

En ce qui concerne les réactions locales d'anaphylaxie aux protéines animales, nous rappellerons que la non spécificité de la sensibilité semble démontrée chez le lapin (Arthus, Fabry, Lamna, Daddi). Chez le cobaye, nous avons constaté que quelques protéines hétérologues (sérum de lapin et de mouton), parmi plusieurs examinées (sérum de lapin, de mouton, de bœuf et d'homme, blanc d'œuf), provoquent, mais d'une manière inconstante, des réactions cutanées chez les cobayes sensibilisés avec du sérum de cheval.

#### DÉSSENSIBILISATION.

La phase de désensibilisation qui suit le choc anaphylactique, mais fait défaut dans l'allergie, était considérée comme une des différences entre les deux ordres de phénomènes. De ce point de vue encore, l'étude des phénomènes locaux de l'anaphylaxie diminue considérablement l'importance de cette distinction. En effet, l'existence d'un état de désensibilisation aux injections intradermiques ou sous-cutanées de protéines semble plus que douteuse après les expériences de Lamna et de Gratia et Lintz. D'ailleurs, même les auteurs, comme Kahn et Culbertson, qui en admettent l'existence, ne parlent que d'une atténuation de la réaction pendant une période de quelques heures après l'injection désensibilisante.

Nous avons fait des expériences sur des lapins sensibilisés au sérum de cheval, en leur injectant 3 à 5 cent. cubes du même antigène soit par voie veineuse, soit par voie sous-cutanée, et en les éprouvant vingt-quatre heures après par voie dermique. Nous n'avons jamais constaté une diminution de l'intensité des réactions locales, en les comparant aux injections précédentes.

Chez des cobayes sensibilisés au sérum de cheval, même des doses massives d'antigène (10 cent. cube) administrées quelques heures avant l'injection dermique d'épreuve, n'ont pas atténué sensiblement la réaction anaphylactique locale.

D'autre part, le phénomène d'accoutumance à la tuberculine est connu depuis longtemps. Vallée l'avait étudié en vue de permettre le dépistage du *doping* artificiellement provoqué par



les marchands de bestiaux. Dans la suite, Et. Burnet a fait des constatations analogues chez les cobayes tuberculeux. Cette accoutumance à la tuberculine a été observée également chez l'homme au cours de la tuberculinothérapie.

Les anciennes expériences de Moussu ont porté sur la désensibilisation du derme chez l'homme et les bovidés. Chez les cobayes rendus allergiques par des injections de bacilles peu virulents, la désensibilisation du derme a été partiellement réalisée par A. Boquet par un traitement tuberculinique prolongé. Le même auteur a signalé ensuite que l'on peut atténuer, par le même procédé, la sensibilité du derme chez le cobaye tuberculeux. Nous avons repris ses expériences en vue d'obtenir une désensibilisation complète du derme par le traitement tuberculinique prolongé chez le cobaye tuberculeux et d'étudier les caractères de ce phénomène.

Deux lots de 6 cobayes infectés depuis trente-cinq jours par des bacilles bovins (souche Vallée) et présentant une réaction nécrotique à l'injection intradermique de 0 c. c. 01 de tuberculine brute, reçoivent 0 c. c. 025 de tuberculine brute pendant dix jours consécutifs, l'un par voie sous-cutanée (premier lot), l'autre par voie intradermique (deuxième lot).

Le lendemain de la dernière injection, tous les cobayes sont éprouvés par une injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée au dixième. Dans le premier lot (désensibilisation par voie sous-cutanée), la réaction est presque nulle chez 2 cobayes, faible (œdème léger) chez 3 cobayes, papuleuse avec petite zone nécrotique chez 1 cobaye.

Chez les cobayes du deuxième lot (désensibilisation par voie dermique), l'intensité des réactions s'atténue progressivement déjà à partir de la troisième injection désensibilisante.

Le lendemain de la dernière injection désensibilisante, l'injection intradermique d'épreuve ne provoque qu'un œdème léger, sauf chez un seul cobaye qui présente une réaction légèrement hémorragique.

En répétant ensuite les injections d'épreuve à des intervalles de trois jours, nous avons constaté que l'effet de la désensibilisation disparaît progressivement : le retour à la sensibilité initiale se produit vers le dixième jour.

Chez 14 cobayes tuberculeux et allergiques, préparés comme dans l'expérience précédente, l'injection sous-cutanée d'une dose de 1 cent. cube de tuberculine fut très bien tolérée; cette injection massive d'épreuve détermina la désensibilisation complète du derme sans pourtant influencer la durée de l'état de désensibilisation.

Ayant constaté la possibilité de provoquer un état temporaire d'accoutumance chez les cobayes allergiques, nous avons essayé de désensibiliser des cobayes anaphylactiques par le même procédé des injections quotidiennes.

Un lot de 24 cobayes sensibilisés au sérum de cheval reçoit pendant dix jours consécutifs 1 cent. cube du même antigène par voie sous-cutanée. Une injection intradermique d'épreuve effectuée le onzième jour provoque une réaction très intense chez tous les cobayes, plus intense même que les réactions précédant le traitement et que celles des témoins non traités.

Donc, non seulement l'état d'hypersensibilité n'a pas été atténué, mais il a paru, au contraire, accru par le traitement.

Pour expliquer cette différence entre l'état allergique et l'état anaphylactique vis-à-vis du traitement désensibilisant, il suffit peut-être de considérer que la tuberculine n'est pas comparable, comme substance désensibilisante, aux antigènes complets, comme le sérum. Les expériences suivantes montrent les modifications profondes qu'on peut déterminer quand on fait intervenir, pendant l'état d'accoutumance par la tuberculine, un antigène complet comme les bacilles tuberculeux morts.

32 cobayes tuberculeux sont désensibilisés par le procédé des doses faibles répétées de tuberculine (10 injections quotidiennes de 0,025 de tuberculine brute par voie sous-cutanée). Le onzième jour, l'intradermo-réaction à la tuberculine est négative.

Le jour suivant, on injecte à ces cobayes par voie intrapéritonéale, des doses massives de bacilles tués par le chauffage à 120° (50 à 100 milligrammes).

Après deux jours, les 28 cobayes survivant à cette inoculation sont éprouvés par voie dermique avec la tuberculine; on obtient chez tous une réaction très intense.

Cette expérience montre que, contrairement à ce qu'on observe après une épreuve tuberculinique à haute dose, les cobayes désensibilisés qui ont échappé à l'intoxication provoquée par des bacilles morts, récupèrent très rapidement leur sensibilité dermique.

#### TRANSMISSION PASSIVE.

On sait que l'état anaphylactique est constamment transmissible par injection à l'animal neuf de sérum d'animal sensible.

Cette transmissibilité passive a été démontrée dans l'anaphylaxie locale comme dans l'anaphylaxie générale.

La transmission générale de la sensibilité cutanée, qui s'observe dans l'asthme anaphylactique humain, a été effectuée en 1921 par Frugoni. Actuellement la transmission locale de la sensibilité du derme (Prausnitz et Küster) constitue une technique couramment employée en clinique.

Il est également possible de transmettre la réactivité locale de lapin à lapin, soit par injection dans le péritoine d'une forte dose (40 cent. cubes) de sérum sensible (Nicolle), soit par injection sous-cutanée ou intradermique du même sérum (Opie, Carlinfanti et Dorflès).

Nous avons fait des expériences en vue de déterminer si la sensibilité anaphylactique du derme chez le cobaye était également transmissible. La *transmission passive locale* « dermique », selon la technique de Prausnitz et Küster, nous a donné constamment des résultats positifs. Les essais de *transmission générale* de la sensibilité dermique nous ont permis d'obtenir des réactions positives intenses (papuleuses et hémorragiques) seulement quand ils étaient effectués avec des doses massives de sérum de cobaye sensible, soit 10 à 12 cent. cubes.

Cette possibilité constante de transmettre passivement la sensibilité fait défaut dans l'état allergique, ce qui démontre qu'il n'y a pas de circulation d'anticorps suffisant à eux seuls pour donner une réaction allergique, ou tout au moins que ces anticorps ne restent pas longtemps dans le sang. Cette dernière réserve serait peut-être nécessaire pour expliquer le résultat positif obtenu par quelques auteurs (Yamanouchi, Bauer, Sata).

Nous avons répété, à plusieurs reprises, des essais de transmission de la sensibilité dermique à la tuberculine sans obtenir jamais de résultats positifs, même par le procédé de Prausnitz et Küster, et en employant, pour la transmission générale, des doses massives de sérum de cobaye allergique (10 à 12 cent. cubes). Nous avons obtenu des résultats également négatifs en employant le sérum de cobayes qui venaient de sortir de l'état de désensibilisation provoqué par le traitement tuberculinique.

Cependant, ces résultats négatifs ne sont pas suffisants,



comme nous l'avons dit, pour exclure l'hypothèse suivant laquelle, au cours d'une phase du processus de sensibilisation, des anticorps participant à la réaction allergique passent dans la circulation.

Étant donné que la *sensibilité anaphylactique* du type tuberculinique n'est pas transmissible (Dienes), on est conduit à penser que cette absence ou cette rareté des anticorps circulants joue un rôle dans le déterminisme du type particulier de sensibilité.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

De l'ensemble des faits examinés et de nos expériences, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° L'étude des antigènes du bacille tuberculeux et de leur activité n'a pas encore donné des résultats suffisants par eux-mêmes pour permettre d'identifier le mécanisme des réactions tuberculiniques à celui des réactions anaphylactiques.

2° Dans l'allergie tuberculeuse, comme dans les réactions locales d'anaphylaxie, les doses fortes d'antigène sensibilisent mieux que les doses faibles.

3° Ainsi que l'affirme Dienes, il existe chez les cobayes tuberculeux sensibilisés par le sérum de cheval, un stade de sensibilité à cet antigène, qui présente tous les caractères de l'allergie tuberculinique. Ce type de sensibilité est instable puisqu'il est aisément transformable en sensibilité du type anaphylactique commun ; il dépend aussi d'un facteur individuel dont l'existence est démontrée par le fait que parmi les cobayes du même lot, sensibilisés par le même procédé, les uns font le premier, les autres le deuxième type de sensibilité.

4° Les réactions locales allergiques, comme les réactions anaphylactiques, ne sont pas strictement spécifiques.

5° Un état de désensibilisation durable n'est pas démontrable par les réactions locales ni dans l'allergie tuberculinique, ni dans l'anaphylaxie.

Un état d'accoutumance temporaire peut être provoqué chez les sujets allergiques par des injections répétées de tuberculine.

L'accoutumance temporaire, qu'on peut également provoquer dans l'hypersensibilité du type anaphylactique de l'homme,

n'a pas été réalisée dans nos expériences sur l'anaphylaxie locale expérimentale.

6° L'état allergique ne peut pas être transmis passivement, tandis que la réactivité anaphylactique locale, comme l'état d'anaphylaxie générale, est constamment transmissible.

En relatant nos expériences, nous avons examiné les principales différences entre l'anaphylaxie et l'allergie.

Nous croyons pouvoir affirmer que, du point de vue de notre étude, c'est-à-dire sous l'aspect de leurs manifestations locales, la plupart de ces différences apparaissent moins tranchées et les limites entre les deux ordres de phénomènes moins nets.

La différence des caractères essentiels des deux ordres de réactions reste cependant, malgré les recherches de Dienes, l'obstacle le plus important à leur identification.

Toutefois, quelques faits sont déjà sûrement constatés. On peut ainsi affirmer, avec A. Boquet, que du fait que les bacilles tuberculeux avirulents (BCG) et les bacilles morts exercent la même action préparante que les bacilles de Koch vivants et virulents, il ne semble pas qu'une *lésion nodulaire active d'infection* soit la condition nécessaire de cette sensibilité. Cependant, il faut attribuer une grande valeur au tissu tuberculeux, dont la présence, même dans le cas de sensibilisation avec des bacilles morts, montre qu'on ne peut pas le négliger dans l'étude de la pathogénie de l'état allergique. La condition *sine qua non* de l'allergie semble donc, jusqu'à présent, liée à la formation de ce tissu pathologique.

Par ailleurs, même si l'infection ne constitue pas une condition nécessaire pour le développement de l'allergie, il ne faut pas oublier que des modifications tissulaires d'ordre général interviennent dans l'économie du sujet qui devient allergique, ce qui ressort de l'absence dans le sérum d'anticorps susceptibles de transmettre la sensibilité et de l'état de réactivité vis-à-vis des antigènes les plus divers, démontrable chez le sujet tuberculeux.

Enfin, il n'est pas dépourvu d'intérêt de considérer le mode de pénétration de l'antigène dans l'économie comme une des causes principales de l'orientation particulière de la sensibilisation allergique. La voie et les modalités de pénétration de

l'antigène constituant souvent, en effet, un facteur très important des caractères de la réponse de l'organisme (1).

Il suffit peut-être, comme le pense A. Boquet, d'opposer l'absorption rapide de l'antigène protéique et sa pénétration brusque dans la circulation lors de la sensibilisation anaphylactique, à l'absorption lente des produits antigéniques dans les maladies allergisantes et à la diffusion graduelle et prolongée de ces produits au fur et à mesure que le foyer primaire se développe ou que les bacilles morts inoculés se désagrègent, pour expliquer les différences entre les deux types de sensibilité et pour les attribuer au même mécanisme.

## BIBLIOGRAPHIE

- ANTONIAZZI (E.). *Boll. dell'Istit. Sierot.* **14**, Milan, 1935, p. 967.  
 BORDET (P.). *C. R. Soc. Biol.* **107**, 1931, p. 622 et 1465.  
 BORDET (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 1933, p. 572.  
 BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1932, p. 165.  
 BOQUET (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1932, p. 769 et 902.  
 BOQUET (A.) et BRETEY (J.). *Ces Annales*, **52**, 1932, p. 252.  
 BOQUET (A.) et NÈGRE (L.). *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 11.  
 CALMETTE (A.). *L'Infection bacillaire et la Tuberculose*. Masson, édit., 1928.  
 CARLINFANTI (E.). *Ann. d'Igiene*, décembre 1935.  
 CARLINFANTI (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 1936, p. 304 et 395.  
 CARLINFANTI (E.). *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 1936, p. 629.  
 CARLINFANTI (E.). *Pathologica*, **26**, 1934, p. 515.  
 DEBRÉ (R.), PARAF (G.) et DAUTREBANDE (L.). *Ann. Méd.*, **9**, 1921, p. 443 et 454.  
 DIENES (L.). *Journ. Immun.*, **30**, 1931, p. 221.  
 DIENES (L.). *Journ. Bacter.*, **29**, 1935, p. 28.  
 DIENES (L.) et MALLORY. *Amer. Journ. of Path.*, **8**, 1932, p. 689.  
 DIENES (L.) et SCHONHEIT. *Amer. Rev. Tuberc.*, **20**, 1929, p. 92.  
 GAIGINSKI (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 942 et 1276.  
 LAPORTE (R.). *Ces Annales*, **53**, 1933, p. 598.  
 RONDONI (P.). *Boll. Istit. Sierot.*, Milan, août 1932.  
 SAFNZ (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 1050.  
 SANDOR (G.). *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*. Doin, édit., 1935.  
 ZINSSER (H.). *Journ. exp. Med.*, **34**, 1921, p. 495.

(1) Les expériences de Gyorgy, Moro et Witebsky et de Woringer sur la sensibilité du nourrisson au blanc d'œuf nous donnent, à ce propos, un exemple très démonstratif. Ces auteurs ont constaté que l'on ne peut déterminer expérimentalement chez le nourrisson un état de sensibilité par injection intradermique au blanc d'œuf, alors que la sensibilité spontanée par voie buccale est des plus communes. Cependant par les injections intradermiques, on provoque la production d'un anticorps (A) qui fixe l'alexine aux dilutions comprises entre 1/20 et 1/200 d'antigène. Cet anticorps n'est pas démontrable chez le nourrisson spontanément sensible chez lequel on peut, au contraire, mettre en évidence un autre anticorps (B) qui fixe l'alexine avec les dilutions entre 1/2000 et 1/20.000 de l'antigène et qui ne peut être obtenu expérimentalement.



# **ESSAIS DE VACCINATION DU COBAYE PAR LE BCG LE BCG UTILISÉ COMME MOYEN CURATIF DANS LA TUBERCULOSE DU COBAYE**

par I. BALTEANU, A. TOMA et ANA GARAGULI.

(*Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Jassy.*)

Les recherches expérimentales de A. Calmette et de ses collaborateurs (1) ont montré le pouvoir vaccinant du BCG administré par voie digestive, sous-cutanée ou intraveineuse. Ces auteurs ont également remarqué que des injections sous-cutanées de 2 milligrammes de BCG répétées dix fois tous les deux jours, prémunissent mieux les cobayes contre une infection tuberculeuse expérimentale que l'ingestion unique de 20 à 30 milligrammes de ce bacille vaccin.

J. Beerens (2, 3) a constaté que des injections sous-cutanées de doses faibles de vaccin BCG (0 milligr. 01), répétées vingt ou trente fois, tous les deux jours, donnent aux cobayes une résistance à l'infection tuberculeuse que l'injection en une seule fois de 0 milligr. 2 ou 0 milligr. 3 est incapable de leur conférer.

L. Nègre (3), en employant la voie digestive, est arrivé à des conclusions semblables. Il a observé que l'ingestion à cinq reprises, répétée tous les deux jours, de 1 centigramme de BCG, soit en tout 5 centigrammes, confère aux cobayes ainsi vaccinés une résistance à l'infection tuberculeuse d'épreuve un peu plus marquée que celle provoquée par une ingestion unique de 5 centigrammes de BCG. Le même auteur (4) a réussi à renforcer l'état de résistance du cobaye, après la constatation

(1) A. CALMETTE, L. NÈGRE et A. BOQUET. Ces *Annales*, **36**, 1922, p. 625; *ibid.*, **38**, 1924, p. 399; *La vaccination préventive contre la tuberculose par le BCG*, Masson, édit., Paris, 1927.

(2) C. R. de la Soc. de Biol., **112**, 1933, p. 120; *ibid.*, **116**, 1934, p. 120.

(3) C. R. de la Soc. de Biol., **116**, 1934, p. 120.

(4) *Bull. de l'Acad. de Méd.*, **112**, p. 609.

de l'allergie, par des revaccinations répétées deux fois à un mois d'intervalle.

Plus récemment, Ch. Duprez (1) aurait réussi à créer chez le cobaye, à la suite de soixante à quatre-vingt-huit injections sous-cutanées hebdomadaires de 0 milligr. 01 de BCG, un état d'immunité absolue à l'égard d'une inoculation de 0 milligr. 001 d'une souche très virulente de bacilles tuberculeux (souche Vallée).

Nous-mêmes, nous avons démontré (2) que les ingestions de vaccin, répétées sept fois à vingt-cinq jours d'intervalle, à la dose de 5 centigrammes, entretiennent et même augmentent légèrement l'état de résistance contre une infection virulente d'épreuve réalisée par la même voie (digestive).

Enfin, Lévitan, Lokhoff et Kosmodemianski (3) et Lévitan et Lokhoff (4) ont étudié l'action curative du BCG dans la tuberculose expérimentale. Ils ont obtenu chez les cobayes et les lapins infectés de tuberculose et traités avec le BCG des survies relativement plus longues que celles des témoins. Le vaccin a été inoculé par voie sous-cutanée ou intraveineuse à des doses variant de 1/5.000 de milligramme à 3/500 de milligramme, une à onze fois à quatorze jours d'intervalle.

Dans nos expériences, nous nous sommes proposé de rechercher : d'une part, la meilleure technique de vaccination préventive du cobaye à l'aide du vaccin BCG, utilisant dans ce but la méthode des inoculations multiples (à doses très variables); d'autre part, la valeur curative de ce vaccin à l'aide de la même méthode des inoculations multiples.

En outre, dans la plupart de nos expériences, nous avons combiné le traitement préventif avec le traitement curatif chez le même animal, en vue de renforcer l'action curative du vaccin par un traitement préventif préalable.

Nous allons exposer dans un premier chapitre les résultats que nous avons obtenus par l'emploi du vaccin BCG à titre préventif ou préventif et curatif; dans le second chapitre, nous étudierons l'action strictement curative de ce vaccin.

(1) *C. R. de la Soc. de Biol.*, **117**, 1934, p. 832.

(2) *C. R. de la Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 1461.

(3) *Ces Annales*, **45**, 1930, p. 740.

(4) *Ces Annales*, **51**, 1935, p. 160.

I. — Essais de vaccination préventive et curative  
du cobaye  
contre l'infection tuberculeuse à l'aide du vaccin BCG.

Les faits expérimentaux résumés ci-dessus ont mis en relief la supériorité du procédé qui consiste à fractionner les doses de vaccin et à les répéter un grand nombre de fois. L'état de prémunition ainsi obtenu est beaucoup plus fort que celui obtenu par une seule inoculation, cette dernière totalisant la somme des bacilles inoculés en doses fractionnées.

Le problème étant posé, il importait de préciser, par des expériences multiples, les doses les plus efficaces à la réalisation d'une forte immunité.

De plus, nous avons élargi le terrain de la vaccination par le BCG, en essayant d'employer ce vaccin non seulement à titre préventif, mais aussi à titre préventif et curatif chez le même animal.

Les doses de vaccin que nous avons utilisées ont varié de  $1/1.000$  de milligramme à 1 milligramme. Le vaccin a été toujours introduit par voie sous-cutanée et a été répété soit chaque jour, soit chaque dix jours. Considérant la dose de  $1/1.000$  de milligramme assez minime, nous l'avons utilisée seulement en injections journalières; la dose de 1 milligramme étant considérée assez forte, nous l'avons utilisée en injections espacées, à dix jours d'intervalle; les doses moyennes de  $1/100$  de milligramme et de  $1/10$  de milligramme ont été employées en injections journalières et à dix jours d'intervalle.

Les cobayes traités journellement ont reçu cent injections préventives, ceux traités tous les dix jours ont reçu dix injections préventives.

Le nombre des doses administrées à titre préventif et curatif a atteint le chiffre de 290 pour les animaux traités journellement, soit 100 doses à titre préventif et 190 à titre curatif; les cobayes traités tous les dix jours ont reçu jusqu'à vingt huit injections : dix à titre préventif et dix-huit à titre curatif.

Afin de nous rendre compte de la valeur comparative du degré d'immunisation de l'animal inoculé avec de nombreuses



doses de vaccin, nous avons administré à un lot de cobayes une dose unique de BCG, dont le poids était égal ou supérieur à la quantité des bacilles administrés en doses fractionnées.

L'infection d'épreuve a été pratiquée invariablement par l'inoculation d'une dose de 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents, souche Vallée, sous la peau de la cuisse droite.

Un lot de 18 cobayes neufs, inoculés avec la même dose de bacilles virulents, nous a servi comme témoin de l'expérience.

Avant d'exposer le détail de nos recherches, nous exposerons les constatations faites sur l'innocuité du vaccin BCG, sur les réactions locales provoquées par ce vaccin, et sur l'évolution de la réaction tuberculinique chez nos animaux d'expérience.

A. INNOCUITÉ DU VACCIN. — Avec les doses de vaccin employées, nous n'avons remarqué aucune action nuisible sur le développement des animaux; ceux-ci ont toujours conservé une apparence de santé normale, sauf ceux dont les lésions tuberculeuses étaient devenues entre temps assez étendues.

Il ressort de nos protocoles d'expériences que *le vaccin BCG, introduit sous la peau du cobaye, un grand nombre de fois (jusqu'à deux cent quatre-vingt-dix fois) et à des doses variées 1/1.000, 1/100, 1/10 et 1 milligramme n'est pas nuisible pour cette espèce animale.*

B. RÉACTION LOCALE. — Les doses de 1/1.000 de milligramme et 1/100 de milligramme ne provoquent pas de réaction; la dose de 1/10 de milligramme détermine, au point d'inoculation, la formation de petites masses caséeuses, qui se résorbent spontanément; la dose de 1 milligramme de bacilles BCG provoque la formation de petits abcès caséeux, qui guérissent également par résorption spontanée, avec ou sans ouverture à la peau.

C. RÉACTION A LA TUBERCULINE. — La réaction à la tuberculine, effectuée à quinze jours d'intervalle, avec 0 c. c. 1 d'une dilution au 1/10 de tuberculine brute, s'est montrée presque

toujours positive. Son intensité a été faible ou moyenne, se caractérisant, dans le premier cas, par un épaississement de la peau; dans le deuxième cas, par la formation d'œdème non suivi de nécrose.

Après l'inoculation virulente, la réaction tuberculinique est devenue positive chez tous les animaux, sans exception, et d'intensité accrue, allant souvent jusqu'à la nécrose.

Cette constatation se rapproche des faits observés par L. Sayé et J. Domenech (1) chez les enfants vaccinés au BCG, et qui, vivant dans un milieu bacillifère, ont présenté, dans la suite, des réactions intenses à la tuberculine, beaucoup plus souvent que les enfants vaccinés au BCG et vivant dans un milieu indemne de tuberculose.

\*  
\* \*

Nos expériences portent sur 7 séries de cobayes, chaque série recevant une dose déterminée de vaccin.

#### PREMIÈRE SÉRIE : COBAYES TÉMOINS.

Sur les 18 cobayes témoins, qui ont reçu sous la peau de la cuisse droite 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents, souche Vallée, 13 sont morts du soixante-dix-septième au cent soixante-quinzième jour; les 5 survivants ont été sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'infection. A l'autopsie des 13 cobayes morts, on a trouvé des lésions viscérales étendues; 5 présentaient des lésions pulmonaires confluentes; 3 présentaient des lésions étendues spléniques et hépatiques; absence de lésions pulmonaires. Les cobayes sacrifiés après cent quatre-vingt-onze jours présentaient des lésions viscérales généralisées et des lésions confluentes des poumons.

#### DEUXIÈME SÉRIE : VACCINATION PRÉVENTIVE

##### ET VACCINATION PRÉVENTIVE ET CURATIVE

AVEC UNE DOSE DE 1/1.000 DE MILLIGRAMME DE VACCIN BCG.

a) VACCINATION PRÉVENTIVE. — 5 cobayes ont reçu sous la peau quotidienne pendant cent jours 1/1.000 de milligramme BCG, la dose totale inoculée étant de 1/10 de milligramme de vaccin.

Quarante jours après la dernière inoculation de vaccin, les animaux sont infectés avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents, souche Vallée. Tous les animaux sont sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours plus tard.

Un premier cobaye avait le ganglion satellite caséeux, deux tubercules sur

(1) *Rev. de la Tuberc.*, 1931, p. 204.

la rate et absence de lésions sur le foie et sur les poumons. Le deuxième cobaye, outre le ganglion satellite caséux, présentait quelques tubercules sur les poumons; absence de lésions du foie et de la rate. Les trois derniers cobayes avaient des lésions viscérales généralisées, constituées par des tubercules disséminés sur la rate et les poumons et, dans deux cas, par quelques rares tubercules sur le foie.

b) VACCINATION PRÉVENTIVE ET CURATIVE. — 2 cobayes reçoivent par voie sous-cutanée pendant cent jours  $1/1.000$  de milligramme de BCG journellement. L'inoculation virulente ( $1/1.000.000$  de milligramme de bacilles souche Vallée) a été effectuée quarante jours après la dernière dose de vaccin et a été aussitôt suivie par la vaccination curative.

L'un des cobayes succombe cent cinquante jours après l'infection d'épreuve, l'autre est sacrifié cent quatre-vingt-onze jours plus tard, donc après avoir reçu respectivement cent cinquante et cent quatre-vingt-dix injections curatives.

Le premier cobaye présentait à l'autopsie le ganglion satellite caséux, 4 tubercules sur la rate et 8 tubercules sur les poumons. Le second cobaye présentait des lésions viscérales généralisées, discrètes sur la rate et sur le foie, intenses sur les poumons.

*En résumé.* — Une vaccination préventive journalière par voie sous-cutanée avec  $1/1.000$  de milligramme de vaccin BCG effectuée pendant cent jours confère au cobaye une certaine résistance contre l'infection virulente d'épreuve; les lésions trouvées chez certains de ces animaux (2 sur 3), étaient beaucoup moins importantes que celles des animaux témoins non vaccinés.

La vaccinothérapie du cobaye (prémuni au préalable par cent injections journalières de  $1/1.000$  de milligramme BCG), effectuée après l'inoculation virulente pendant une période de temps de cent cinquante à cent-quatre-vingt-dix jours, ne semble pas modifier la marche de l'infection d'épreuve.

TROISIÈME SÉRIE : VACCINATION PRÉVENTIVE  
AVEC DES DOSES DE  $1/100$  DE MILLIGRAMME DE VACCIN BCG,  
SUIVIE OU NON PAR LA VACCINATION CURATIVE.

A. — *Traitement quotidien.*

a) VACCINATION PRÉVENTIVE. — 3 cobayes ont reçu sous la peau, journellement la dose de  $1/100$  de milligramme de vaccin BCG pendant cent jours, soit une quantité de 1 milligramme de vaccin. Quarante jours après la dernière inoculation du vaccin, ces cobayes ont été infectés avec  $1/1.000.000$  de milligramme de bacilles virulents souche Vallée.



A l'autopsie des animaux sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'épreuve virulente, nous avons constaté les lésions suivantes : un premier cobaye présentait le ganglion régional caséux, 4 tubercules sur la rate et 2 sur les poumons ; aucune lésion sur le foie. Un deuxième cobaye avait un petit ganglion régional caséux ; la rate, le foie et les poumons étaient indemnes de toute lésion. Le troisième cobaye avait un gros ganglion régional caséux, quelques tubercules sur la rate ; le foie et les poumons étaient indemnes.

b) VACCINATION PRÉVENTIVE ET CURATIVE. — 2 cobayes ont reçu cent injections (une par jour) de 1/100 de milligramme de vaccin BCG.

Après l'inoculation virulente de 1/1.000.000 de milligramme de bacilles souche Vallée, les animaux ont été soumis à un nouveau traitement journalier pendant cent quatre-vingt-dix jours consécutifs avec la même dose de 1/100 de milligramme de vaccin.

Sacrifiés le cent quatre-vingt-onzième jour, nous avons trouvé les lésions suivantes : un premier cobaye présentait un petit chancre local avec un ganglion satellite dur, liquéfié au centre, et 7 tubercules sur la rate ; le foie et les poumons étaient indemnes. Un deuxième cobaye présentait le ganglion satellite caséux ; absence de toute lésion viscérale.

## B. — *Traitement par des doses espacées de dix jours.*

a) VACCINATION PRÉVENTIVE. — 2 cobayes ont reçu sous la peau dix injections préventives de 1/100 de milligramme de BCG. Les inoculations étaient faites à dix jours d'intervalle.

Quarante jours après la dernière dose de vaccin, ils ont été infectés avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles souche Vallée.

Sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'inoculation virulente, les animaux ont présenté les lésions suivantes : le premier, un gros ganglion satellite caséux et quelques tubercules sur la rate ; le foie et les poumons indemnes ; le second, des lésions viscérales généralisées, notamment une grosse rate avec masses caséuses.

b) VACCINATION PRÉVENTIVE ET CURATIVE. — 2 cobayes ont reçu dix injections préventives de 1/100 de milligramme, à des intervalles de dix jours. Quarante jours plus tard, ils sont infectés avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée et traités dans la suite par des injections sous-cutanées de 1/100 de milligramme de BCG à dix jours d'intervalle.

L'un d'eux succombe cent cinquante jours après l'épreuve virulente, après avoir reçu quinze injections curatives. Il présentait à l'autopsie un ganglion régional caséux et des lésions étendues de la rate et des poumons. Le deuxième est sacrifié cent quatre-vingt-onze jours après l'épreuve virulente (dix-neuf injections curatives) ; à l'autopsie, il présentait un ganglion satellite caséux ; absence de toute lésion viscérale.

*En résumé*, la vaccination sous-cutanée préventive effectuée par l'inoculation de 100 doses journalières de 1/100 de milligramme de BCG, confère au cobaye une forte résistance à

l'infection d'épreuve, celle-ci étant réalisée par la même voie avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Tandis que les cobayes vaccinés de la manière ci-dessus et sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'épreuve virulente, présentaient des lésions limitées seulement à la caséification des ganglions régionaux ou à la formation de quelques rares tubercules sur les viscères, les cobayes témoins, appartenant à la première série (animaux non vaccinés) présentaient des lésions viscérales graves généralisées.

La vaccination curative des cobayes ayant reçu cent injections préventives de 1/100 de milligramme de BCG ne semble pas avoir modifié d'une manière évidente la résistance des cobayes contre l'infection d'épreuve, même si le traitement curatif comportait 190 doses journalières. Il paraît que la résistance ait acquis son maximum à la suite du seul traitement préventif.

Dix injections préventives, de 1/100 de milligramme de BCG, à dix jours d'intervalle et complétées ou non par des injections curatives de la même dose aux mêmes intervalles, sont nettement moins efficaces que cent injections journalières de la même dose.

#### QUATRIÈME SÉRIE : COBAYES AYANT REÇU DES DOSES DE VACCIN DE 1/10 DE MILLIGRAMME DE BACILLES BCG.

##### A. — *Vaccination par doses journalières.*

a) TRAITEMENT PRÉVENTIF. — 2 cobayes ont reçu journellement sous la peau 1/10 de milligramme de vaccin BCG pendant cent jours, soit une dose totale de 10 milligrammes. Ils sont infectés quarante jours après la dernière administration de vaccin, avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours plus tard, ils présentaient à l'autopsie un ganglion régional caséeux, gros comme une noisette; l'un d'eux présentait en plus quelques tubercules sur les poumons, la rate et le foie étant normaux; l'autre présentait quelques tubercules sur la rate et sur le foie; les poumons étant indemnes.

b) TRAITEMENT PRÉVENTIF ET CURATIF. — Un autre cobaye a continué à recevoir à titre curatif 174 doses journalières de 1/100 de milligramme de vaccin BCG après les cent injections préventives de 1/10 de milligramme chacune et après avoir reçu la dose infectante. Il succombe le jour de la dernière injection de vaccin et présente à l'autopsie un petit chancre local, un ganglion régional caséeux, rate et foie normaux, et un petit tubercule translucide sur le poumon droit, dans lequel on a trouvé des bacilles acido-résistants.

### B. — Vaccination par doses espacées à dix jours d'intervalle.

a) TRAITEMENT PRÉVENTIF. — 1 cobaye a reçu 10 doses sous-cutanées de 1/10 de milligramme de BCG, à dix jours d'intervalle, soit une dose totale de 1 milligramme de vaccin. Il a été infecté quarante jours après la dernière dose vaccinante, à l'aide de 1/1.000.000 de milligramme de bacilles souche Vallée, sous la peau de la cuisse droite. Sacrifié cent quatre-vingt-onze jours après l'inoculation virulente, il présentait le ganglion régional caséux, 5 tubercules sur la rate et 2 sur les poumons.

b) TRAITEMENT PRÉVENTIF ET CURATIF. — Chez 3 cobayes qui ont reçu les 10 doses de 1/10 de milligramme BCG à dix jours d'intervalle, on a continué, après l'infection virulente d'épreuve, la vaccination avec les mêmes doses administrées au même intervalle. Les 3 animaux sont morts le cinquantième, le cent dix-neuvième et le cent quatre-vingt-quatrième jour. Le premier cobaye présentait à l'autopsie un petit ganglion satellite avec un point de caséum central. Le deuxième cobaye présentait un petit ganglion satellite caséux et quelques tubercules sur les poumons, avec rate et foie normaux; le troisième avait le ganglion satellite caséux et quelques tubercules sur la rate et sur les poumons.

*En résumé*, l'inoculation préventive, répétée journellement cent fois ou dix fois tous les dix jours, de 1/10 de milligramme de vaccin BCG, confère au cobaye une résistance marquée à l'inoculation virulente d'épreuve effectuée avec une dose de 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Tandis que les animaux témoins, non vaccinés, présentaient à l'autopsie des lésions généralisées très graves et même confluentes, les cobayes vaccinés ne présentaient que des lésions discrètes, constituées par un ou quelques tubercules disséminés dans les viscères.

La vaccination curative, comme complément de la vaccination préventive, effectuée, soit par des injections journalières de 1/100 de milligramme de vaccin BCG, soit par des doses de 1/10 de milligramme espacées à dix jours d'intervalle, et continuées pendant toute la durée de l'expérience, n'a pas marqué de progrès en ce qui concerne la résistance des animaux contre l'infection virulente, cette résistance ayant déjà atteint le plafond à la suite des inoculations préventives.

Les cobayes inoculés cent fois et ceux inoculés seulement dix fois avec la dose de 1/10 de milligramme de vaccin BCG se sont comportés d'une manière presque identique vis-à-vis de l'infection virulente, leur résistance ayant été égale dans les deux cas.



CINQUIÈME SÉRIE : COBAYES AYANT REÇU DES DOSES DE VACCIN  
[DE 1 MILLIGRAMME DE BCG,  
ADMINISTRÉES A DIX JOURS D'INTERVALLE.

a) TRAITEMENT PRÉVENTIF. — 2 cobayes ont reçu dix injections de 1 milligramme de vaccin, à dix jours d'intervalle, soit une dose totale de 10 milligrammes de vaccin BCG.

Les deux animaux ont été sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'inoculation virulente d'épreuve. A l'autopsie, on a constaté un petit chancre d'inoculation, le ganglion satellite caséeux et quelques tubercules sur la rate dans les deux cas; chez l'un des animaux on a constaté en plus 5 tubercules pulmonaires; le foie est resté indemne dans les deux cas.

b) TRAITEMENT PRÉVENTIF ET CURATIF. — 4 cobayes ont reçu dix injections préventives à 1 milligramme de vaccin BCG répétées tous les dix jours. Après l'infection virulente (1/1.000.000 de milligramme de bacilles souche Vallée, inoculé quarante jours après la dernière dose de vaccin) les animaux ont continué à recevoir à titre curatif 18 autres doses de 1 milligramme de vaccin BCG toujours à dix jours d'intervalle. Tous les animaux ont été sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours après l'inoculation virulente.

Autopsie : Les 4 cobayes présentaient un ganglion satellite caséeux; la rate était atteinte dans 3 cas (3 à 6 tubercules), les poumons dans 2 cas (quelques tubercules); le foie est resté indemne dans les 4 cas.

Nous n'avons pas fait d'inoculations journalières avec la dose de 1 milligramme de vaccin BCG.

*En résumé*, la vaccination préventive avec une dose de 1 milligramme BCG, répétée dix fois tous les dix jours, confère au cobaye un degré de résistance, qui est sensiblement du même ordre que celui obtenu par dix ou cent injections de vaccin à la dose de 1/10 de milligramme.

Les doses de 1/10 de milligramme et de 1 milligramme ont le même effet vaccinant, qu'elles soient injectées tous les jours (doses de 1/10 de milligramme) ou tous les dix jours (doses de 1/10 et 1 milligramme de vaccin).

Le traitement curatif, réalisé par 12 doses de 1 milligramme de BCG administrées à dix jours d'intervalle, comme suite à la vaccination préventive, n'influe pas, généralement, sur la marche de l'infection virulente. Les animaux ainsi vaccinés présentaient des lésions analogues à celles trouvées chez les cobayes n'ayant subi que le traitement préventif.

SIXIÈME SÉRIE : VACCINATION PRÉVENTIVE AVEC DES DOSES UNIQUES  
DE 1 MILLIGRAMME ET 10 MILLIGRAMMES DE BCG,  
SUIVIE OU NON PAR LA VACCINATION CURATIVE.

A. — *Vaccination préventive.*

a) DOSE UNIQUE DE 1 MILLIGRAMME DE BCG. — 3 cobayes sont vaccinés par voie sous-cutanée avec une dose unique de 1 milligramme de vaccin BCG et quarante jours après, ils sont infectés par la même voie avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée.

L'un d'eux succombe cent trente jours après l'infection : nous avons trouvé à l'autopsie un petit chancre local avec le ganglion satellite caséux, une grosse rate avec nombreux tubercules, trois petites infiltrations caséuses sur le foie et de nombreux tubercules sur les poumons. Le deuxième succombe après cent soixante-quinze jours, présentant un petit chancre local, le ganglion satellite caséux, des infiltrations caséuses dans la rate et tubercules sur le foie et les poumons. Le troisième est sacrifié après cent quatre-vingt-onze jours ; à l'autopsie, il présentait un gros ganglion satellite caséux et de nombreux tubercules pulmonaires.

b) DOSE UNIQUE DE 10 MILLIGRAMMES. — 3 cobayes ont reçu sous la peau une dose unique de 10 milligrammes de vaccin BCG. L'épreuve virulente (toujours la même dose de 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée) a été pratiquée quarante jours après l'inoculation de vaccin.

Le premier cobaye est mort soixante-dix-neuf jours après l'épreuve virulente, présentant à l'autopsie un petit chancre local, avec le ganglion satellite caséux et quelques tubercules sur la rate ; le deuxième cobaye est mort après cent soixante-quatre jours ; il présentait le ganglion satellite caséux, des masses caséuses sur la rate et de rares tubercules sur les poumons ; le troisième cobaye est sacrifié après cent quatre-vingt-onze jours ; nous avons trouvé des lésions viscérales étendues et notamment de très nombreux tubercules pulmonaires et quelques cavernes.

B. — *Vaccination préventive et curative.*

a) DOSE PRÉVENTIVE DE 1 MILLIGRAMME DE BCG SUIVIE D'UN TRAITEMENT CURATIF JOURNALIER. — 2 cobayes sont vaccinés sous la peau par une injection unique de 1 milligramme de bacilles BCG ; quarante jours après, ils sont inoculés par la même voie, avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Le lendemain de l'inoculation virulente, on commence le traitement curatif par des injections journalières de 1/100 de milligramme de BCG. Les animaux sont sacrifiés cent quatre-vingt-onze jours plus tard, après avoir reçu cent quatre-vingt-dix injections curatives. A l'autopsie, nous avons trouvé : chez le premier cobaye, le ganglion régional caséux et absence de toute lésion viscérale ; chez le deuxième cobaye, un gros ganglion régional caséux, un tubercule sur la rate, et absence de toute lésion du foie et des poumons.

b) DOSE PRÉVENTIVE UNIQUE DE 10 MILLIGRAMMES SUIVIE D'UN TRAITEMENT CURATIF JOURNALIER. — 2 cobayes sont inoculés sous la peau avec une dose unique de 10 milligrammes de vaccin BCG. Quarante jours plus tard, ils sont infectés avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents, souche Vallée. L'inoculation virulente a été suivie aussitôt, comme dans l'expérience précédente, par une vaccination curative journalière de 1/100 de milligramme de vaccin BCG. Les 2 cobayes de cette expérience sont sacrifiés après cent quatre-vingt-onze jours, c'est-à-dire, après avoir reçu cent quatre-vingt-onze injections curatives de 1/100 de milligramme de BCG sous la peau.

A l'autopsie, ils présentaient des lésions presque identiques : 1 ganglion satellite caséeux, 2 et 3 tubercules sur la rate respectivement et absence de toute lésion hépatique ou pulmonaire.

*En résumé*, la vaccination sous-cutanée du cobaye par des doses uniques de 1 milligramme et de 10 milligrammes de vaccin BCG confère à cette espèce animale une certaine résistance, mais peu marquée et transitoire : au bout de cinq à six mois, les lésions trouvées à l'autopsie, sont égales à celles des cobayes témoins non vaccinés de la première série.

La vaccination journalière curative avec une dose de 1/100 de milligramme entreprise chez les cobayes qui ont déjà reçu sous la peau la dose préventive unique de 1 milligramme ou de 10 milligrammes de BCG, augmente fortement leur résistance vis-à-vis de l'infection virulente. La résistance ainsi acquise est pareille à celle obtenue chez les cobayes vaccinés par un grand nombre de doses. Tandis que les animaux inoculés seulement à titre préventif sont morts après soixante-dix-neuf, cent soixante-quatre et cent quatre-vingt-onze jours, présentant à l'autopsie des lésions étendues de tuberculose viscérale, ceux qui ont continué, après l'inoculation virulente, à être vaccinés avec des doses journalières curatives de 1/100 de milligramme chacune, ont acquis un degré de résistance très marquée. Ils ne présentaient à l'autopsie que des lésions ganglionnaires et un début de lésions sur la rate.

#### SEPTIÈME SÉRIE : VACCINATION SOUS-CUTANÉE PAR 100 DOSES A 1/100 DE MILLIGRAMME SUIVIE D'INFECTION PAR VOIE DIGESTIVE.

4 cobayes sont vaccinés préventivement par voie sous-cutanée par cent injections journalières à la dose de 1/100 de milligramme de bacille BCG. Un mois après la dernière injection de vaccin, les animaux sont infectés par voie stomacale, avec une dose de 1 milligramme de bacilles virulents, souche Vallée. Les cobayes meurent spontanément après quatre-vingt-dix-sept, cent

vingt, cent vingt-trois et cent cinquante-quatre jours, présentant à l'autopsie des petits ganglions mésentériques caséux. Le premier cobaye ne présentait que cette lésion, le deuxième présentait en plus, 3 tubercules sur l'un des poumons; le troisième, une plage caséuse sur la rate, le quatrième, quelques tubercules sur le même organe.

*En résumé*, malgré l'absence de cobayes témoins, infectés par voie digestive, cette expérience mérite sa place ici, car elle nous permet d'affirmer que la vaccination sous cutanée, avec 100 doses quotidiennes de 1/100 de milligramme de BCG, n'empêche pas l'absorption des germes virulents par voie digestive, ainsi que leur dissémination et leur multiplication dans les viscères.

## II. — Essais de vaccination curative du cobaye contre l'infection tuberculeuse à l'aide du vaccin BCG.

### A. — INFECTION ET VACCINATION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

Dans les recherches précédentes, nous avons montré que la vaccination curative du cobaye, effectuée par voie sous-cutanée, est capable, dans certaines conditions d'expérience, et comme suite à une vaccination préventive préalable, d'entretenir et même d'exalter la résistance du cobaye contre une infection virulente d'épreuve.

Dans le présent chapitre, nous relaterons les résultats obtenus par l'emploi du vaccin BCG administré seulement à titre curatif chez des cobayes qui ont reçu l'infection virulente, sans avoir subi, au préalable, une vaccination préventive.

Dans ces expériences, nous avons utilisé 88 cobayes. Tous ces animaux ont été infectés sous la peau de la cuisse droite avec 1/1.000.000 de milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Après l'infection, ils ont été répartis en deux séries.

**PREMIÈRE SÉRIE : ANIMAUX TÉMOINS.** — Cette série est constituée par 20 cobayes témoins non vaccinés. 10 d'entre eux sont morts entre quatre-vingt-treize et cent vingt jours. Les 10 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Tous présentaient, à l'autopsie, un chancre d'inoculation et la caséification des ganglions satellites. Les lésions viscérales étaient plus ou moins étendues et avaient envahi soit tous les viscères, soit seulement certains d'entre



eux : la rate a été trouvée dix-huit fois malade et deux fois indemne, le foie, neuf fois malade et onze fois indemne ; les poumons, seize fois malades et quatre fois indemnes.

DEUXIÈME SÉRIE. — *Premier groupe : Dose de 1/1.000 de milligramme de BCG.* — 10 cobayes ont été vaccinés curativement tous les jours avec 1/1.000 de milligramme de bacille BCG. 4 d'entre eux sont morts respectivement après quatre-vingt-six, cent huit, cent treize et cent vingt jours, les 6 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Ils ont donc reçu entre 86 et 125 doses sous-cutanées de vaccin. A l'autopsie, tous les animaux présentaient un chancre local avec le ganglion satellite caséeux. Les lésions viscérales étaient toujours constantes. La rate a été trouvée neuf fois malade et une fois indemne ; les poumons, six fois malades et quatre fois indemnes ; le foie, cinq fois malade et cinq fois indemne.

Il ressort de cette expérience que le traitement curatif avec une dose journalière de 1/1.000 de milligramme de vaccin BCG reste inefficace : les lésions des cobayes vaccinés curativement avec cette dose, pendant quatre-vingt-six à cent vingt-cinq jours, étaient pareilles à celles du groupe des cobayes témoins non vaccinés.

*Deuxième groupe : Dose de 1/100 de milligramme de BCG.* — a) *Traitement curatif quotidien.* — 10 cobayes sont traités journellement, après l'infection d'épreuve, avec une dose de 1/100 de milligramme de bacille BCG. 6 d'entre eux sont morts entre quatre-vingt-six et cent vingt et un jours ; les 4 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Tous les cobayes présentaient un chancre local avec les ganglions satellites caséeux, ainsi que des lésions viscérales : la rate a été trouvée neuf fois malade et une fois indemne ; le foie, six fois malade et quatre fois indemne, et les poumons, sept fois atteints et trois fois indemnes.

Les lésions locales et viscérales ont été donc environ du même ordre que celles des cobayes témoins non vaccinés.

b) *Traitement curatif administré à dix jours d'intervalle.* — 9 cobayes sont vaccinés tous les dix jours avec la même dose de 1/100 de milligramme BCG. 6 d'entre eux sont morts entre quatre-vingt-cinq et cent deux jours, les 3 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Ils ont reçu entre huit et douze injections curatives.

*Autopsie :* Chancre local et ganglion satellite caséeux chez tous les animaux. Lésions viscérales : la rate a été trouvée six fois malade, trois fois indemne ; le foie, six fois malade, trois fois indemne ; et les poumons, cinq fois malades et quatre fois indemnes.

Les lésions viscérales des animaux de ce groupe étaient sensiblement égales à celles du groupe des animaux témoins non vaccinés.

*Troisième groupe : Dose de 1/10 de milligramme BCG.* — a) *Traitement curatif quotidien.* — 10 cobayes sont inoculés tous les jours avec une dose de 1/10 de milligramme de bacilles BCG. 7 d'entre eux sont morts entre quatre-vingts et cent vingt-quatre jours et les 3 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Nous avons trouvé à l'autopsie dans tous les cas un chancre d'inoculation et les ganglions satellites caséeux, ainsi que des lésions viscérales généralisées, ces dernières paraissant être nettement plus étendues que celles des animaux témoins.

La vaccination curative effectuée avec cette dose de vaccin a donc aggravé la marche de l'infection virulente.

b) *Traitement curatif administré à dix jours d'intervalle.* — 9 cobayes sont

vaccinés tous les dix jours avec la dose de  $1/10$  de milligramme de bacilles BCG. 2 d'entre eux sont morts entre quatre-vingt-douze et cent cinq jours, les 7 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. A l'autopsie, les animaux présentaient un chancre d'inoculation avec le ganglion satellite caséeux. Lésions viscérales : la rate était six fois atteinte, trois fois indemne ; le foie, deux fois malade et sept fois indemne ; les poumons, cinq fois atteints et quatre fois indemnes.

La vaccination pratiquée dans ces circonstances a été suivie de l'apparition d'une certaine immunité, traduite dans un nombre de cas par un retard dans l'apparition et la progression des lésions viscérales.

*Quatrième groupe : Dose de 1 milligramme de BCG — a) Traitement curatif administré à dix jours d'intervalle.* — 8 cobayes sont vaccinés tous les dix jours avec une dose de 1 milligramme de bacilles de BCG. 5 d'entre eux sont morts entre quatre-vingts et cent seize jours, les trois autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour. Tous les animaux ont présenté à l'autopsie un chancre d'inoculation avec le ganglion satellite caséeux. Les lésions viscérales observées ont été les suivantes : rate, cinq fois malade, trois fois indemne ; poumons, cinq fois atteints, trois fois indemnes ; foie, trois fois atteint, cinq fois indemne.

Les lésions viscérales ont été donc moins généralisées que dans le groupe des animaux témoins non vaccinés.

*b) Traitement curatif administré à un mois d'intervalle.* — 11 cobayes sont vaccinés tous les mois avec 1 milligramme de vaccin de BCG. 3 d'entre eux sont morts entre quatre-vingts et cent seize jours. Les 8 autres ont été sacrifiés le cent vingt-cinquième jour.

Tous les animaux présentaient à l'autopsie un chancre local et le ganglion satellite caséeux. Viscères : la rate était huit fois atteinte, trois fois indemne ; le foie, six fois atteint, cinq fois indemne ; les poumons, sept fois atteints, quatre fois indemnes.

Les lésions viscérales des animaux de ce groupe ont été un peu moins généralisées que dans le groupe des animaux témoins non vaccinés.

*En résumé,* la vaccination curative du cobaye à l'aide du vaccin BCG, entreprise aussitôt après l'infection virulente (1 millionième de milligramme de bacilles souche Vallée) nous a donné les résultats suivants :

La dose de  $1/1.000$  de milligramme de BCG employée journellement, et la dose de  $1/100$  de milligramme de BCG, employée également tous les jours, ou tous les dix jours, se sont montrées inefficaces.

La dose de  $1/10$  de milligramme employée tous les jours s'est montrée même nuisible ; elle a aggravé la marche de l'infection virulente ; la même dose de  $1/10$  de milligramme inoculée tous les dix jours, ainsi que de 1 milligramme inoculée également tous les dix jours ou tous les mois, ont un léger effet vaccinant.

Dans les conditions de nos expériences, l'efficacité de la vaccination curative apparaît assez incertaine ; dans certaines

circonstances, telle que la vaccination avec des doses assez élevées (1/10 de milligramme et 1 milligramme de vaccin BCG) et espacées de dix à trente jours d'intervalle, l'envahissement des viscères paraît moins précoce.

**B. — INFECTION PAR VOIE DIGESTIVE, SUIVIE DE VACCINATION  
PAR LA MÊME VOIE OU PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.**

Dans cette série de recherches, nous avons essayé de préciser la valeur de la vaccination curative par l'emploi du vaccin BCG chez les cobayes préalablement infectés par voie digestive.

23 cobayes du même âge et du même poids sont infectés par voie stomacale avec la dose de 1 milligramme de bacilles virulents souche Vallée. Ensuite, les animaux ont été répartis en trois lots :

a) Un premier lot de 9 cobayes a été conservé comme témoin; les animaux de ce lot n'ont reçu que l'ingestion virulente.

b) Un deuxième lot de 6 cobayes a été vacciné par voie digestive; les ingestions de vaccin ont commencé douze jours après l'infection virulente. La dose de vaccin employée a été constante de 3 centigrammes et a été régulièrement répétée tous les dix jours.

c) Un troisième lot de 8 cobayes, répartis en deux groupes égaux, a été vacciné par voie sous-cutanée. Le premier groupe de 4 cobayes a été vacciné avec la dose de 1 milligramme de BCG, le second groupe avec la dose de 1/10 de milligramme de ce vaccin. Les doses de vaccin ont été régulièrement répétées à dix jours d'intervalle.

**RÉSULTATS.** — a) Les 9 cobayes témoins sont morts entre cent et deux cent dix-sept jours, la survie moyenne étant de cent cinquante-neuf jours. Tous les animaux présentaient à l'autopsie des ganglions mésentériques augmentés de volume et caséifiés et des lésions viscérales plus ou moins généralisées, mais d'intensité assez modérée. La rate a été trouvée six fois atteinte et trois fois indemne, les poumons, six fois atteint et trois fois indemnes, et le foie, trois fois atteint et six fois indemne.

b) Les 6 cobayes vaccinés par voie digestive sont morts entre cent vingt-cinq et cent soixante et onze jours, la durée moyenne de leur survie a été de cent cinquante-sept jours recevant entre douze et dix-sept ingestions de vaccin. A l'autopsie, on a trouvé les ganglions mésentériques augmentés de volume et caséieux. Les lésions viscérales d'intensité moyenne se présentaient ainsi : la rate, quatre fois atteinte et deux fois indemne; les poumons, trois fois atteints et trois fois indemnes; le foie, deux fois atteint et quatre fois indemne.

Il résulte donc que la vaccination par voie digestive effectuée à titre curatif reste inefficace contre l'infection virulente provoquée par la même voie digestive.

c) *Cobayes vaccinés par voie sous-cutanée.* — Les 4 cobayes qui ont reçu entre 16 et 35 doses de 1 milligramme, vaccin BCG, donc entre 16 et 35 milligrammes de vaccin, sont morts entre cent soixante à trois cent cinquante-huit jours après l'infection virulente, soit une survie moyenne de deux cent vingt-sept jours.

A l'autopsie, on a trouvé dans tous les cas les ganglions mésentériques augmentés de volume et caséux; la rate et le foie étaient deux fois atteints et deux fois indemnes, les poumons, une fois atteints et trois fois indemnes.

Les cobayes vaccinés par voie sous-cutanée avec 1/10 de milligramme sont morts entre cent sept et trois cent quatre-vingt-deux jours, la survie moyenne étant de deux cent seize jours. Ils ont reçu entre dix et trente-huit injections de vaccin, donc entre 1 milligramme et 3 milligr. 8 de vaccin.

A l'autopsie, les ganglions mésentériques étaient augmentés de volume et caséux dans tous les cas. Les lésions viscérales étaient sensiblement égales à celles des cobayes vaccinés avec la dose de 1 milligramme. Le foie a été trouvé deux fois atteint, deux fois indemne; la rate, trois fois atteinte, une fois indemne; les poumons, une fois atteints, trois fois indemnes.

*En résumé*, la vaccination curative effectuée par voie sous-cutanée avec des doses de 1 milligramme et 1/10 de milligramme, répétées tous les dix jours, a ralenti nettement la marche de l'infection tuberculeuse, provoquée par l'administration *per os* de 1 milligramme de bacilles virulents. La résistance des animaux s'est traduite par une survie plus longue que celle des animaux témoins (deux cent seize et deux cent vingt-sept jours de survie pour les vaccinés, au lieu de cent cinquante-neuf jours pour les témoins), et par des lésions viscérales moins généralisées.

### Résumé et conclusions générales.

1° Le vaccin BCG, administré sous la peau du cobaye, un grand nombre de fois (de dix à deux cent quatre-vingt-dix fois) à des doses variant entre 1/4.000 de milligramme à 1 milligramme, n'est pas nuisible pour cette espèce animale; les doses de 1/10 à 1 milligramme de vaccin, déterminent l'apparition de petites masses caséuses qui se résorbent avec ou sans ouverture à la peau.

2° La vaccination du cobaye par le BCG, effectuée dans ces conditions, provoque un état d'allergie constatée par la réaction à la tuberculine (0 c.c. 1 d'une dilution au 1/10 de tuberculine brute).

3° Les résultats enregistrés varient d'après la dose utilisée



pour la vaccination, sans qu'il y ait de parallélisme constant entre l'augmentation des doses et l'augmentation de la résistance contre l'infection tuberculeuse: les doses moyennes de  $1/100$  à  $1/10$  de milligramme de vaccin BCG, donnent les meilleurs résultats. Les doses faibles ( $1/1.000$  de milligramme) ne donnent qu'une augmentation légère ou même nulle de la résistance du cobaye contre l'infection tuberculeuse d'épreuve. Les doses fortes de 1 milligramme ont une valeur d'immunisation égale à celle obtenue avec les doses de  $1/100$  et  $1/10$  de milligramme.

a) La vaccination préventive du cobaye avec des doses de  $1/1.000$  de milligramme répétées par voie sous-cutanée pendant cent jours consécutifs est d'une faible valeur immunisante, même si elle a été continuée après l'infection d'épreuve, par un traitement curatif intense (150 ou 190 doses quotidiennes de  $1/1.000$  de milligramme de BCG).

b) Des résultats plus favorables ont été enregistrés après une vaccination préventive avec 100 doses journalières de  $1/100$  de milligramme de BCG; les cobayes ainsi traités, à l'encontre des animaux témoins qui ont fait une tuberculose grave généralisée, présentaient, cent quatre-vingt onze jours après l'infection virulente, des lésions limitées aux ganglions de la région ou à la formation de quelques rares tubercules dans les viscères. Les mêmes doses, administrées à dix jours d'intervalle, paraissent beaucoup moins efficaces.

c) Les doses préventives de  $1/10$  de milligramme de vaccin de BCG, administrées tous les jours (100 doses préventives) ou tous les dix jours (10 doses préventives) ont le même pouvoir vaccinant que 100 doses préventives de  $1/100$  de milligramme de BCG.

L'infection virulente d'épreuve n'a provoqué chez les cobayes, après cent quatre-vingt-onze jours, que des lésions discrètes, constituées par un ou quelques tubercules disséminés dans les viscères (animaux témoins, cent quatre-vingt onze jours après l'infection: lésions généralisées et confluentes très graves). Nous insistons sur l'efficacité du traitement préventif à doses espacées de dix jours, surtout pour le côté pratique du problème et la réalisation facile de l'immunité de la tuberculose.

Il semble que l'état d'immunité atteigne son maximum par la simple vaccination préventive ; la prolongation du traitement par une vaccination curative, après l'infection d'épreuve, n'augmente pas la résistance de l'animal.

d) 10 doses préventives de 1 milligramme de BCG, administrées toujours par voie sous-cutanée, à dix jours d'intervalle déterminent l'apparition d'une résistance sensiblement égale à celle obtenue avec 10 à 100 doses de 1/10 de milligramme.

e) La vaccination sous-cutanée du cobaye par une dose unique préventive de 1 milligramme ou 10 milligrammes de BCG, ne confère qu'une résistance nettement moins marquée et transitoire (au bout de cinq mois les lésions sont identiques à celles des témoins). Le traitement curatif appliqué à ces animaux (190 doses journalières de 1/100 de milligramme) détermine la même résistance que celle obtenue chez les cobayes vaccinés par un grand nombre de doses préventives.

4° Le traitement curatif du cobaye, effectué à l'aide du vaccin BCG par de nombreuses doses journalières de 1/1.000 à 1/100 de milligramme, administré sous la peau, après l'infection virulente (1/1.000.000 de milligramme de bacilles de la souche Vallée par voie sous-cutanée) reste inefficace ; la dose quotidienne de 1/10 de milligramme de BCG est même aggravante. Les doses de 1/10 et de 1 milligramme de vaccin, répétées tous les dix jours paraissent avoir une légère efficacité.

La vaccination curative par voie digestive chez des cobayes infectés préalablement par la même voie, reste inefficace. Au contraire, la vaccination curative, effectuée par voie sous-cutanée avec des doses de 1 milligramme et 1/10 de milligramme de BCG, répétées à dix jours d'intervalle, chez des cobayes infectés par voie digestive (1 milligramme de bacille de la souche Vallée) donne des résultats favorables. Les cobayes vaccinés de cette manière survivent soixante-huit et cinquante-sept jours respectivement aux animaux témoins.

Malgré leur valeur relative, ces résultats sont néanmoins intéressants, étant donné la faible capacité du cobaye à se laisser immuniser contre la tuberculose.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MODE DE MULTIPLICATION DU BACILLE DE KOCH

par JEVREM NEDELKOVITCH,  
docent de l'Université de Belgrade.

(*Clinique médicale de Belgrade.*  
Directeur : professeur A. RADOSSAVLJEVIC.)

Cinquante-trois ans après la découverte du bacille tuberculeux, on n'est pas encore fixé sur sa biologie. On n'est d'accord ni sur sa morphologie, ni sur son mode de multiplication, ni même sur sa place dans le monde végétal. En ce qui concerne la multiplication, de nombreux auteurs ont avancé des faits qui parlent contre la conception classique de la division directe, mais ces faits diffèrent tellement avec chaque auteur, qu'il est impossible d'en tirer aucune conclusion.

R. Koch [1] avait pensé, au début, que les parties non colorées du bacille étaient des spores, mais il est revenu plus tard sur cette opinion. Nocard et Roux [2] se sont prononcés dans le même sens plus catégoriquement, alors que Kitasato [3] considérait ces parties comme mortes. Beaucoup d'anciens auteurs, tels que Malassez et Vignal, von Schrön, Semmer, Crookshank, Schürmayer, Ernst, Maher [4], Strauss et d'autres ont parlé de granulations du bacille et ont pensé que ces granulations jouent le rôle principal dans sa multiplication. C'est ainsi que pour von Schrön [5], les bacilles jeunes ne sont qu'un ensemble de granules disposés en chaînettes (*Torulaketten*). Ces granules s'éloignent les uns des autres par la croissance, comblant les espaces entre eux par les produits de leur sécrétion, et c'est ainsi que le bacille atteint sa forme adulte. Lors d'une transformation régressive, les produits de sécrétion disparaissent, les granules deviennent libres, et, prenant les caractères de spores, ils s'encapsulent, s'accroissent et produisent dans leur intérieur de nouveaux granules, qui

vont donner naissance à une nouvelle génération de bacilles.

C. Spengler [6] avait soutenu que les « Splitter » des bacilles du type bovin sont de véritables spores, alors que ceux du type humain ne sont que des corpuscules sporoides (sporöide Körperchen). Les « Splitter » ne se colorent pas par la fuchsine phéniquée dans le corps bacillaire, ils ne se colorent que lorsqu'ils sont libres ou lorsque leur enveloppe a été dissoute. Pour son élève von Betegh [7], les « Splitter » des bacilles du type humain sont des spores aussi bien que ceux du type bovin. En outre, ils se colorent par sa méthode « b-Tollin » en bleu-noir, même dans le corps bacillaire, alors que l'enveloppe se colore en rouge. De ces spores émanent de petits bâtonnets fins, qui ne sont pas acido-résistants d'abord, mais le deviennent plus tard. Ces bâtonnets acido-résistants sont d'abord homogènes, puis, au cours du mûrissement ultérieur, leur protoplasme se segmente, il s'y forme des cavités où sont logées des petites formations ovales ou rondes réfringentes, qui ne sont autre chose que des spores. Dans un bâtonnet on peut trouver 2, 3, 4 spores.

Much [8] a décrit des granules qui existent *uniquement dans l'organisme malade et non dans les cultures*, et qui ne se colorent pas par le Ziehl-Neelsen, mais par le Gram ou par la double coloration de Gram et de Ziehl. Ils se disposent en chaînettes ou sont isolés, et proviennent des bacilles acido-résistants, dont les leucocytes ont entamé l'enveloppe cireuse. Par leurs ferments lipolytiques, étudiés surtout par Bergel [9], les leucocytes dissolvent les acides gras qui donnent l'acido-résistance, alors que les graisses neutres résistent, et enveloppent les granules faits eux-mêmes de substances protéiniques qui ne peuvent être lysées que par les ferments protéolytiques. Les bâtonnets non acido-résistants se produisent de la même façon. La virulence de ces granules et de ces bâtonnets non acido-résistants n'est pas diminuée par ce fait. Les granules ne se multiplient pas comme tels. Ils peuvent cependant donner naissance aux bâtonnets acido-résistants, mais doivent, au préalable, s'incorporer des substances grasses qu'ils ont perdues. Ces granules ne sont pas des spores : parce qu'il y en a plus de deux dans un bâtonnet, parce qu'ils ne sont pas égaux, ne résistent pas au chauffage à



60°, se colorent et se décolorent facilement, juste le contraire de ce que font les spores.

Knoll [10], tout en admettant les idées de Much pense que les bacilles ne se multiplient que par l'intermédiaire des granules. Ces granules quittent le bâtonnet, pour donner chacun immédiatement naissance à un bâtonnet nouveau, lorsque le bacille est dans de bonnes conditions. Par contre, quand le bacille se trouve dans de mauvaises conditions, il perd d'abord son acido-résistance, puis se désagrége en libérant les granules qui peuvent rester à l'état de granules pendant des années, et ne se développer en bâtonnets que lorsque les conditions redevennent favorables. Pour Knoll, ces granules sont des spores endogènes.

Wherry [11] considère aussi que les corpuscules ovoïdes, colorés en bleu-noir par Ziehl, dont le diamètre dépasse celui du corps bacillaire sont des spores. Il les a trouvés dans l'expectoration provenant de vieilles cavernes, dans les cultures mixtes, ainsi que dans de vieilles cultures.

A. Meyer [12], à l'encontre de tous ces auteurs, admet que ces granulations ne sont autre chose que des matières lipoides de réserve. Calmette [13] était également du même avis.

Bezançon et Philibert [14], dans leurs études des voiles jeunes, arrivent à la conclusion que le virus tuberculeux doit, pour se multiplier, passer par un cycle compliqué. A l'intérieur du bacille acido-résistant mûr se forment des granules qu'ils appellent corpuscules chromophiles, avides de couleur et prenant le Gram. Les bacilles acido-résistants dégénèrent assez rapidement pour ne laisser persister que ces corpuscules chromophiles. De ces corpuscules naissent de longs filaments non acido-résistants, cyanophiles, qui, dans les voiles, se disposent en bandes dessinant des colonnes, des travées qui se recourbent et se rejoignent, délimitant ainsi des aréoles claires. Ces filaments se transforment à un moment donné en bacilles acido-résistants, mais ceci, *uniquement en quelques points*. Dans ces bacilles acido-résistants, se produisent de nouveaux corpuscules chromophiles, et le cycle recommence. Les corpuscules chromophiles sont des éléments de résistance du parasite et des éléments de reproduction. Ce sont des spores qui ne diffèrent des autres spores (par exemple spores téta-

niques ou spores du vibrion septique) que par la moindre résistance à la chaleur. Le bacille acido-résistant ne représente qu'un stade d'évolution, peut-être éphémère, du parasite hautement différencié.

Fontes [15] admet que le bacille tuberculeux subit, avant la multiplication, une lyse, ainsi que tous les autres bacilles. Il se désagrège en granules visibles, ceux-ci en particules invisibles. Ces particules invisibles, après s'être débarrassées des substances inutiles, se réorganisent par une force vitale en nouveaux granules visibles, qui se groupent pour former des bâtonnets. Il arrive, parfois, que lors de ce nouveau regroupement des granules en bâtonnets, les caractères des nouveaux bacilles changent, et ne ressemblent plus aux caractères des bacilles dont ils proviennent. Les granules sont pour Fontes de la substance nucléaire, disposée dans le corps bacillaire sous la forme de poussière chromidiale, qui ne se ramasse en granules que lors de la multiplication.

D'après Kirchenstein [16] aussi, les granules sont de la substance nucléaire. Ces granules peuvent être intrabacillaires ou libres. Les granules libres ne sont pas des spores, tout en ayant la faculté de donner des bâtonnets. La multiplication du bacille se fait par division, mais de la façon suivante : avant la division, il apparaît un petit noyau sur le bord de la paroi cellulaire. De celui-ci part un fin filament vers un autre noyau qui apparaît plus tard. Le premier noyau se divise alors, et, avec lui, le filament, de sorte qu'on voit un triangle dans le protoplasme bacillaire. Enfin, le second noyau se divise et après cela le bâtonnet lui-même.

Morton Kahn [17], dans ses études faites sur un seul bacille, à l'aide du micromanipulateur de Chambers, décrit ainsi le cycle évolutif du bacille tuberculeux. Le bâtonnet se divise d'abord en 3 à 4 corpuscules ovalaires, acido-résistants ou entourés d'une mince zone de substance acido-résistante. Ces corpuscules se divisent en deux et prennent l'aspect de diplocoques. La subdivision de ces coques se continue assez rapidement pour donner des grains et des particules de plus en plus petites non acido-résistantes, dont quelques-unes sont à la limite de la visibilité. De ces particules, le plus souvent groupées en amas, naissent les plus délicats bâtonnets qu'on

puisse imaginer, qui deviennent ensuite des bacilles acido-résistants adultes. Ce cycle évolutif dure huit à dix jours et même plus (jusqu'à trente-six jours). Les bacilles jeunes ne se divisent jamais par segmentation directe.

(Erskov [18] considère que les conclusions de Morton Kahn sont erronées et pense que les granules dont il parle représentent les parties désagrégées du bacille mort. Le bacille se multiplie, d'après cet auteur, exclusivement par division transversale directe. Mais, la croissance des nouveaux bacilles se faisant juste dans les parties proches de la ligne de séparation, les nouveaux bacilles font un angle entre eux (Winkel-Wachstum).

M. Kahn et José Nonidez [19], en étudiant des coupes de cultures sur un milieu à l'œuf et des coupes de voiles sur le milieu de Long, concluent que les bacilles tuberculeux se développent des granules non acido-résistants qui deviennent acido-résistants ensuite. Les stades les plus jeunes du bacille se trouvent le plus loin du milieu, parce que c'est là qu'il y a le plus d'oxygène.

Vaudremer [20] admet que les granules sont des spores au sens botanique du mot et non au sens que lui donnent les bactériologistes.

E. Gróh [21] a étudié le développement des bacilles du type bovin et humain en goutte pendante dans un milieu favorable. Cet auteur pense que les bacilles se multiplient exclusivement par l'intermédiaire des granules. Il distingue les gros granules noirs, et les granules rouge foncé dans la coloration par le Ziehl-Neelsen. Les granules noirs, colorés métachromatiquement en noir même par la fuchsine seule, se rencontrent dans les vieilles cultures, les granules rouges dans les cultures jeunes. La multiplication se fait de cette manière : dans le bacille adulte apparaissent, du côté intérieur de la membrane, des granules dont le nombre peut être de 1 à 8. En grandissant, ces granules font éclater la membrane bacillaire et deviennent ainsi libres. Chaque granule commence alors à bourgeonner. A l'extrémité du fin bourgeon apparaît un petit granule polaire qui grandit et atteint la grosseur du premier granule. Si le bourgeonnement se fait dans deux directions, on aura un bâtonnet avec trois granules, s'il se fait dans une direction, on aura un bâtonnet

avec deux granules. A l'intérieur du nouveau bâtonnet apparaissent des nouveaux granules qui deviennent libres, et le cycle recommence. Chaque granule polaire peut à son tour bourgeonner, et donner un bâtonnet avec un autre petit granule polaire, et c'est ainsi que se fait la croissance en longueur. Dans de mauvaises conditions, le granule primitif disparaît complètement, de sorte que, dans les longs filaments, il ne reste qu'un petit granule polaire. L'auteur n'a jamais vu de division directe ni de ramifications. Il a rencontré des granules qui bourgeonnent latéralement, ce qu'on pouvait prendre pour des ramifications. Les granules sont des spores, les bâtonnets des sporanges.

Sweany [22] pense que le bacille peut se multiplier aussi par division directe, lorsqu'il se trouve en bonnes conditions. Dans de mauvaises conditions, il se désagrège en granules, dans lesquels se condense la matière nucléaire. De ces granules poussent de fins filaments, qui sont mobiles au début, non acido-résistants et Gram positifs. Ils perdent plus tard leur mobilité et deviennent acido-résistants. Dans de très mauvaises conditions, les granules perdent définitivement leur acido-résistance, et même la capacité de donner des bâtonnets. Ils se multiplient alors comme granules, donnant des colonies de cocci et de tétrades.

Pour Ravettlat et Armengol y Pla [23], les bâtonnets acido-résistants représentent la forme de résistance du virus tuberculeux et ont tous les caractères de spores. Ces bâtonnets ne sont pas pathogènes comme tels, et ne se multiplient pas comme tels. Ils doivent, pour se multiplier, d'abord passer par une des deux formes : forme d'attaque ou forme intermédiaire. Dans la forme d'attaque, le virus se présente comme coque ou diplocoque, streptocoque, tétrade, phytoglée, avec diplo- ou streptocoque comme forme prédominante, tous non acido-résistants, mais Gram positifs. Cette forme est la plus pathogène et la plus viable. Son développement est rapide sur tous les milieux et ressemble à celui des bactéries banales. Dans la forme intermédiaire, on trouve des granules de Much, corpuscules intracellulaires de Ravettlat-Pla, des jeunes bacilles dans les cultures, des bacilles en massue, pseudo-diphthériques, strepto-bacilles, tous non acido-résistants. Cette forme est plus



résistante, mais moins pathogène que la forme d'attaque.

Karwacki [24] pense que le virus tuberculeux peut exister sous les cinq formes suivantes : virus filtrant, granules et bâtonnets cyanophiles, bacilles acido-résistants et champignons *Streptothrix*. Toutes ces formes peuvent se développer et vivre comme telles, ce qui dépend des conditions extérieures. Le bacille acido-résistant se multiplie dans les bonnes conditions par division directe, dans les conditions défavorables, ils se désagrègent en granules petits comme de la poussière. Ces petits grains grandissent d'abord, pour donner ensuite chacun un bâtonnet. Ce dernier mode de multiplication se produit surtout après ensemencement des exsudats pleuraux. Mais les bâtonnets développés de ces grains d'abord cyanophiles, acido-résistants plus tard, restent plus petits que les bacilles acido-résistants habituels, et ne poussent pas au cours des repiquages ultérieurs.

Comme on peut voir de ce court résumé des travaux, les opinions sont très discordantes sur le mode de multiplication du bacille de Koch, de sorte qu'on *ne peut absolument pas les rapprocher et en faire une synthèse*. Nous ne pouvons pas entrer dans la discussion de ces opinions, car cela allongerait trop notre mémoire. Nous nous bornerons à faire l'exposé succinct des faits que nous avons observés et qui montrent à l'évidence comment le bacille se multiplie dans les conditions que nous avons choisies.

### Observations personnelles.

Avant d'exposer nos observations relatives à la multiplication du bacille de Koch, nous décrirons en quelques mots sa structure morphologique telle que nous l'avons toujours vue.

#### STRUCTURE DU BACILLE TUBERCULEUX.

Le bacille observé soit dans les cultures, soit dans le matériel tuberculeux (expectoration, pus, organes tuberculeux des hommes et des animaux d'expérience) présente, coloré au Ziehl-Neelsen, trois éléments constants : *Une substance centrale* rouge foncé, *rouge bordeaux*, *une substance périphérique* rouge clair, enfin *le granule noir*.

SUBSTANCE CENTRALE. — La substance centrale peut être unie, mais, le plus souvent, elle est fragmentée en deux ou plusieurs fragments dont chacun ébauche une subdivision, de sorte que ces fragments prennent l'aspect de diplobacilles ou de diplocoques. Nous appellerons les premiers : *fragments primaires*, et le produit de leur subdivision : *fragments secondaires*. Entre les fragments primaires, on voit un espace clair soit rouge pâle, soit décoloré. Cet espace est souvent étranglé, et d'autant plus étranglé et plus décoloré qu'il est [plus grand. *La substance centrale est pour nous le protoplasme bacillaire* (voir fig. 1, 2, 3, 7, 10 b, 17).

SUBSTANCE PÉRIPHÉRIQUE. — La substance périphérique est très probablement la membrane du bacille. Elle est *rouge clair*, de sorte qu'on la distingue facilement de la substance centrale rouge bordeaux. Les espaces rouge clair ou décolorés qu'on voit entre les fragments primaires ne sont autre chose que les parties de cette membrane où il n'y a pas de substance centrale. Ces espaces peuvent être non seulement décolorés, mais aussi étranglés (voir fig. 1, 2, 3, 7, 10 b, 17).

GRANULE NOIR. — Le granule noir décrit également par Wherry, Sweany, Luksch [25], et Gróh entre autres, est le troisième élément morphologique du bacille, quoi qu'on ne l'observe pas dans tous les bacilles. Par exemple, on ne le trouve pas dans les bacilles des couches jeunes attenantes au milieu nutritif, on le trouve, par contre, dans les bacilles des couches supérieures et plus épaisses des voiles, couches qui se sont éloignées du milieu nutritif. On le rencontre aussi bien dans les cultures que dans le matériel tuberculeux (expectoration, pus, exsudat, etc.).

Lorsque dans un bâtonnet on voit des granules noirs, la substance centrale disparaît : elle est remplacée par ces granules. Le granule noir est de grandeur très différente : il peut être gros, dépassant la largeur du bacille, comme il peut être petit, plus petit que le diamètre du bacille. Il se colore en bleu noir, presque noir par le Ziehl-Neelsen. Il peut être unique, situé alors au centre ou à un pôle du bacille (« bacille en massue »), ou multiple. Chaque fragment primaire peut être

remplacé par un granule noir, alors plus petit que le granule unique. S'il y a deux fragments primaires, on a deux granules à chaque pôle, s'il y en a trois, il y aura trois granules. Même les fragments secondaires peuvent être remplacés par les granules noirs, mais encore plus petits, leur grandeur correspondant à la quantité de substance centrale remplacée. Il arrive assez souvent que tous les fragments d'un bâtonnet ne se transforment pas en granules noirs, de sorte qu'on y trouve en même temps les granules noirs et les fragments rouge bordeaux de la substance centrale. Nous avons rencontré des bacilles dans lesquels, dans un fragment primaire, un des fragments secondaire s'est transformé en granule noir, alors que l'autre est resté rouge bordeaux (voir fig. 2, 3, 12).

Dans les vieilles cultures, on trouve aussi, à côté des granules noirs intrabacillaires, des *granules noirs libres* de différentes grandeurs. Dans les plus gros, on voit un centre rouge lorsqu'on tourne la vis micrométrique. Ces granules deviennent libres par la disparition de la membrane qui les unissait (voir fig. 4, 11, 12).

Nous verrons dans ce qui suit la fonction de chacun de ces trois éléments dans la reproduction du bacille.

#### MULTIPLICATION.

Pour voir comment le bacille de Koch se multiplie, nous avons observé comment se développent les colonies en partant de l'exsudat de pleurésie sérofibrineuse commune le plus souvent et quelquefois de celui de péritonite et du pneumothorax artificiel, toujours après en avoir obtenu une culture positive auparavant. Nous avons choisi ce matériel, parce que les bacilles y sont ordinairement très rares, de sorte qu'on peut admettre, avec une grande probabilité que chaque colonie qui apparaît, s'est nécessairement développée en partant d'un seul ou de peu de bacilles.

Dans les études faites sur des bacilles prélevés des cultures, on ne peut pas distinguer d'une façon sûre les bacilles jeunes et vivants, de ceux qui sont vieux ou même morts. Avec notre procédé, on est certain que les bacilles qu'on voit apparaître sont toujours vivants et en train de se multiplier. Il fallait seulement imaginer un moyen pour trouver les colonies le plus

tôt possible après l'ensemencement de l'exsudat, et suivre ensuite leur développement. Le milieu de Buc, recommandé par Besançon et Buc pour la culture du bacille tuberculeux dans les exsudats séro-fibrineux, nous a semblé favorable à cette étude, car il s'est montré très sensible, puisque nous y avons obtenu des cultures riches, repiquables, de bacilles de Koch typiques, dans 80 p. 100 de cas de pleurésie commune. En outre, les colonies s'y développent sur un tampon de coton, sur lequel se fixe la fibrine, entraînant avec elle les cellules et les bacilles tuberculeux. Ces éléments forment ensemble des petites nodosités sur les fils de coton, qu'on peut facilement voir au microscope, soit même à la loupe. C'est dans ces nodosités qu'on trouve les premières colonies de bacilles. Ces colonies deviennent souvent visibles, même à l'œil nu, dix à douze jours après l'ensemencement de l'exsudat.

TECHNIQUE. — L'exsudat à examiner est ensemencé dans 15 à 20 tubes. Tous les jours, ou tous les deux jours, on sort le tampon de coton d'un tube ensemencé, et on le met dans une boîte de Petri contenant de la solution physiologique stérile. En s'aidant d'une forte loupe, on choisit une touffe de fils de coton sur lesquels il y a le plus de nodosités. On la met sur une lame, on laisse sécher sous cloche, et on colore, après fixation à la flamme, au Ziehl-Neelsen en faisant attention que la petite touffe de coton ne s'en aille pas pendant les lavages.

Nous avons fait également des essais avec des coupes histologiques en série du tampon tout entier, mais nous y avons renoncé, parce que les résultats sont bien moins clairs, à cause des nombreuses erreurs possibles. Nous nous sommes arrêtés définitivement au seul examen direct, car les causes d'erreur sont minimales et le dérangement des colonies presque nul. Les colonies colorées en rouge sont facilement visibles au microscope, et, comme il n'y a pas d'impuretés gênantes, les résultats obtenus sont tout à fait clairs et d'interprétation facile.

Nous avons pu étudier ainsi *in situ* les colonies tout au début de leur formation, âgées de deux ou quelques jours, comme des colonies âgées de dix à douze jours et visibles à l'œil nu. Pour illustrer nos observations, nous avons fait des dessins et des microphotographies en couleur (1). Nous pouvons affirmer que

(1) Les photographies en couleur ont été exécutées à l'Institut d'Histologie de la Faculté de Médecine de Belgrade, grâce à l'obligeance de son directeur, professeur A. Kostitch, auquel nous exprimons nos vifs remerciements.



ces illustrations sont véridiques et le plus souvent inférieures à la nature, qui est encore plus démonstrative.

### ÉTUDE DES COLONIES TOUTES JEUNES.

Cas n° 739 : exsudat de péritonite séro-fibreuse, ensemencé le 9 juin 1934. A l'examen du 13 juin, on trouve une colonie des plus typiques, tout au début de son développement. Elle est composée de quelques rangées de bâtonnets acido-résistants séparés par des espaces décolorés. Chaque bâtonnet est lui-même fragmenté en fragments primaires et secondaires. On ne peut s'expliquer cet arrangement de bâtonnets qu'en admettant qu'ils se sont multipliés par division transversale directe et restés bout à bout (fig. 5).

Cas n° 708 : exsudat séro fibrineux de pleurésie commune, ensemencé le 16 juin 1934. A l'examen du 24 juin, on trouve des bâtonnets acido-résistants, dont la substance centrale rouge-bordeaux est fragmentée, et des bâtonnets à granule unipolaire. A côté de ces deux sortes de bacilles, on trouve des granules noirs libres, avec un centre rouge (fig. 6).

Cas n° 559 : exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune (fig. 7), est également très démonstratif. On voit nettement que la fragmentation de la substance centrale rouge-bordeaux représente la multiplication du bacille. La libération des nouveaux bacilles se voit très distinctement au bas de la figure où la rangée a été cassée par le traumatisme. La cassure s'est faite exactement au niveau des espaces décolorés.

Cas n° 667 : exsudat du pneumothorax artificiel, ponctionné le 3 mars 1934, ensemencé le 14 juin, après avoir été gardé à la température du laboratoire. On étale avant l'ensemencement 1 goutte de dépôt qui s'était formé, qu'on examine après coloration au Ziehl-Neelsen. On y trouve, après de longues recherches, quelques bâtonnets acido-résistants, dont quelques-uns montrent une fragmentation typique, et de nombreux granules noirs libres (fig. 8 a).

Le 16 juin, donc deux jours après l'ensemencement, on trouve de nombreux bacilles à granule noir unipolaire (fig. 8 b). On trouve même une vraie petite colonie de ces bacilles (fig. 8 c).

On peut facilement voir qu'il y a une différence entre ces bacilles à granule unipolaire : les uns sont de courts bâtonnets rouge-violet, d'autres des bâtonnets plus longs et plus rouges (fig. 8 b). Aucun de ces bâtonnets n'est fragmenté.

On voit, par contre, une troisième espèce de bâtonnets à granule unipolaire chez lesquels la substance centrale est différenciée et en train de se fragmenter (fig. 8 d).

Un fait très important est à noter : alors que dans le dépôt examiné avant l'ensemencement, on ne trouve pas de bâtonnets à granule noir unipolaire, on en trouve beaucoup deux jours après l'ensemencement. On ne peut pas s'empêcher de penser qu'une étroite relation existe entre les granules noirs libres et ces bâtonnets à granule noir unipolaire et notamment que ces bâtonnets proviennent des granules noirs libres par bourgeonnement. Le premier stade de ce bourgeonnement est représenté par le fin bâtonnet rouge-violet émergeant du granule noir (fig. 8 b, en bas, à gauche). Ce bâtonnet s'allonge, devient plus rouge, et commence à se fragmenter, c'est-à-dire à se multiplier.

Le 19 juin, donc cinq jours après l'ensemencement, on fait un nouveau

prélèvement. On trouve, à côté des bâtonnets à granule noir unipolaire, de vraies petites colonies dont la plus typique est dessinée dans la figure 8 e. Elle est composée de rangées de bâtonnets rouges séparés par des espaces décolorés et fragmentés eux-mêmes. Dans cette jeune colonie, on ne voit pas de granules noirs.

Le douzième jour, les colonies étaient visibles à l'œil nu. Au microscope, on a trouvé des colonies adultes typiques que nous décrirons plus loin (fig. 13).

Cas n° 732 : exsudat de pleurésie séro-fibrineuse commune,ensemencé le 4 avril 1934. Au prélèvement du 11 avril, on trouve, à côté de granules noirs libres, des courts bâtonnets rouge-violet pâle, émergeant des granules noirs (fig. 9).

On ne peut pas se représenter qu'ils puissent être autre chose que de tout jeunes bourgeons de ces mêmes granules noirs libres.

Cas n° 557 : exsudat de pleurésie séro-fibrineuse commune,ensemencé le 8 novembre 1933. Au prélèvement du 13 novembre, on examine la membrane qui entoure le tampon. On y trouve des granules noirs libres et de rares bâtonnets acido-résistants (fig. 10 a).

Dans les coupes histologiques en série du tampon, on trouve des granules noirs libres et des granules d'où émergent de courts et fins bâtonnets rouge-violet. On trouve également plusieurs colonies composées de 2 à 4 bâtonnets rouges (fig. 10 b).

Les colonies sont devenues visibles à l'œil nu en seize jours.

D'après ces quelques exemples, on peut voir que les colonies trouvées les premiers jours après l'ensemencement se présentent soit comme *des rangées de bâtonnets acido-résistants*, soit comme *des bâtonnets à granule noir*.

Les rangées de bâtonnets acido-résistants ne peuvent être expliquées qu'en supposant que *ces bâtonnets se sont multipliés par division transversale directe et restés bout à bout*. Entre chaque bâtonnet, il existe un espace décoloré où les deux bâtonnets se séparent au moindre attouchement. Chaque bâtonnet est fragmenté en fragments primaires et secondaires. Les espaces entre les fragments primaires deviennent les espaces entre les bâtonnets, les fragments secondaires deviennent les fragments primaires et ainsi de suite.

Les bâtonnets à granule unipolaire proviennent, d'après ce que nous avons pu observer jusqu'à présent, des granules noirs libres par bourgeonnement. Le premier stade de ce bourgeonnement est représenté par les fins bâtonnets violets. Ce fin bourgeon s'allonge d'abord, tout en restant homogène, puis la substance centrale, rouge plus foncé, se différencie au moment où elle commence à se fragmenter. Avec cette fragmentation de la substance centrale commence justement la multiplication

du bacille. Mais les bâtonnets à granule unipolaire ne sont pas toujours des bourgeons, c'est-à-dire des bacilles qui recommencent la vie végétative. Dans les vieilles cultures ou dans d'autres occasions, ils peuvent représenter juste le contraire; des bacilles qui se mettent en état de repos ou de résistance en condensant leur protoplasme dans les granules noirs. Le bâtonnet rouge, au lieu de représenter le bourgeon sortant du granule noir, représente la membrane vide. Ces deux états peuvent être différenciés cependant quand le bourgeon est tout jeune, car il est alors violet.

#### ÉTUDE DES COLONIES ADULTES.

Les colonies plus âgées ont un aspect tout à fait caractéristique; elles se composent de *longs cordons pelotonnés* faisant de grandes circonvolutions. Ces cordons sont eux-mêmes formés par des rangées parallèles de bâtonnets acido-résistants. Chaque bâtonnet est lui-même fragmenté, tout comme nous l'avons décrit plus haut. Dans ces bacilles, on trouve souvent des granules noirs. La figure n° 13 est une photographie en couleur de la culture n° 663 (qui est la même culture que 667), âgée de douze jours, qui nous montre la forme de la colonie agrandie 110 fois et qui n'exige aucun commentaire. La figure 14 la montre agrandie 1.050 fois. On voit un faisceau très jeune et en plein développement où on distingue très bien les rangées de bâtonnets acido-résistants.

La même culture n° 667 a été examinée trente-deux jours après l'ensemencement, alors que le tampon bourré de grosses colonies était tombé au fond du tube. On trouve, à l'examen microscopique, des colonies formées des mêmes cordons décrits plus haut, mais les bacilles contiennent presque tous des granules noirs. On y rencontre toutes les variations possibles, qui nous montrent à l'évidence le rapport entre la substance centrale et le granule noir. On trouve des bacilles où toute la substance centrale a été remplacée par des granules noirs, et d'autres qui contiennent dans une partie des granules noirs dans l'autre des fragments rouge foncé. On rencontre des bacilles où les fragments secondaires ont été remplacés par des granules noirs, mais petits. Enfin, on en trouve de tels là ou

dans un fragment primaire un fragment secondaire a été transformé en granule noir, alors que l'autre est resté rouge foncé (fig. 2 et 12).

Ces variations démontrent que *les granules noirs se forment aux dépens de la substance centrale dont ils peuvent remplacer toute la masse ou une de ses parties.*

#### ÉTUDE DES VOILES DES CULTURES EN SURFACE.

Nous avons fait l'étude de quelques voiles développés à la surface du milieu de Buc. Cette étude nous a donné des résultats identiques à ceux obtenus sur le tampon de coton.

TECHNIQUE. — Avec une spatule, on transporte de très fines pellicules de voile sur la lame où on a déposé 1 goutte de solution physiologique stérile. On retire ensuite avec du papier filtre stérile la goutte de solution physiologique, on laisse sécher, on fixe par flambage à l'alcool et on colore au Ziehl-Neelsen.

Nous avons examiné ainsi des voiles jeunes, âgés de quatre à cinq jours, ainsi que d'autres plus âgés.

Les tout jeunes voiles sont faits d'une seule couche des mêmes rangées de bâtonnets acido-résistants décrits plus haut. Les bacilles sont fragmentés d'une façon tout à fait analogue à celle des colonies développées sur le tampon de coton. On n'y voit presque pas de granules noirs (fig. II, 16, 17, 19). Les rangées ont tendance à se grouper en faisceaux.

Les voiles plus âgés se composent de deux ou plusieurs couches. Il y a d'autant plus de couches que le voile est plus âgé. La couche attenante au milieu nutritif est composée des mêmes rangées de bacilles que dans les voiles à une seule couche. Les couches supérieures sont faites de faisceaux plus épais, qui font des mailles entre eux. Ces faisceaux sont identiques aux cordons des colonies adultes développées sur le coton du milieu de Buc. Ces faisceaux sont également faits de rangées de bâtonnets acido-résistants tout comme les cordons (fig. I, 15). On trouve très souvent des bâtonnets contenant des granules noirs, et d'autant plus que la couche s'éloigne du milieu nutritif.



## ETUDE DE LA SUBSTANCE PÉRIPHÉRIQUE (MEMBRANE).

La fragmentation de la substance centrale, c'est-à-dire du protoplasme se fait plus vite que celle de la membrane. Alors que le protoplasme bacillaire est divisé, la membrane reste encore unie. Les espaces entre les fragments primaires qui en s'agrandissant deviennent des bâtonnets nouveaux s'étranglent

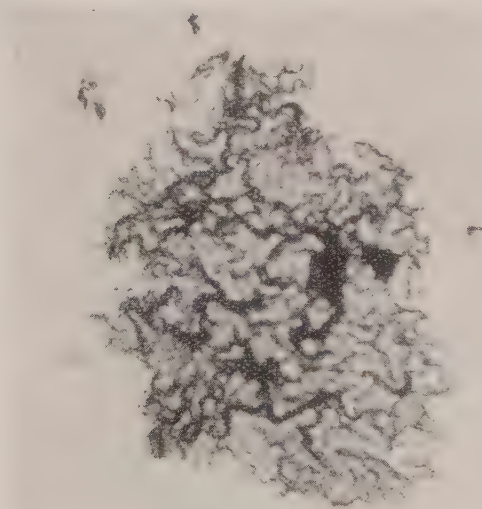


FIG. 1. — Voile jeune montrant deux couches : supérieure composée de faisceaux épais, et inférieure plus fine. (Gross. : 300 fois.)

et se décolorent. C'est à leur niveau que les bâtonnets se séparent au plus petit traumatisme. La substance périphérique peut parfois rester unie, alors que la substance centrale a été le siège de divisions transversales nombreuses. On obtient alors des bâtonnets géants, fragmentés (fig. 23). Quelques-uns de ces fragments peuvent être remplacés par des granules noirs.

Il arrive parfois que ni la substance centrale ni la membrane ne se divisent, on a alors de très longs filaments unis, comme de véritables fouets (fig. 24).

Ces anomalies de développement démontrent également que

*la croissance de bacille se fait en longueur, et la multiplication par division transversale directe.*

\*  
\* \*

De notre matériel on peut voir que les colonies toutes jeunes ainsi que les adultes, aussi bien dans les voiles que sur les tampons de coton, sont formées uniquement par des bâtonnets

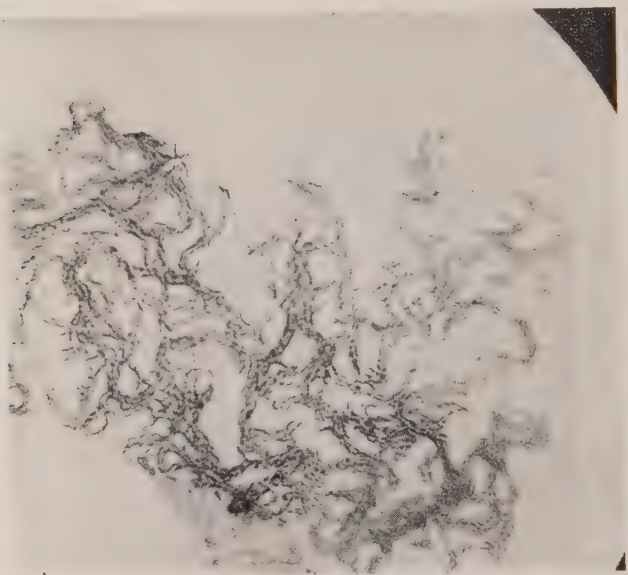


FIG. II. — Voile très jeune composé d'une seule couche de rangées de bâtonnets fragmentés et acido-résistants. (Gross. : 4.100 fois).

acido-résistants. Ces bâtonnets étant fragmentés donnent presque toujours l'impression d'être granuleux. Mais il faut bien distinguer les fragments protoplasmiques rouge-bordeaux des granules noirs. Les fragments rouges ne sont autre chose que de nouveaux individus produits par la division directe du protoplasme au fur et à mesure de sa croissance. Lorsque pour une cause quelconque cette croissance est gênée, le protoplasme se condense en granules noirs, et la division cesse aussi par ce fait. *Les granules noirs représentent donc un arrêt*

*de développement et de multiplication du protoplasme, alors que les fragments rouges en sont l'expression même.*

Les granules noirs peuvent devenir libres, comme nous l'avons vu par la disparition de la membrane. Dans ces granules la vie végétative recommencera lorsque les conditions redeviennent favorables, par le phénomène de bourgeonnement, que nous avons décrit à propos du cas n° 667. Nous n'avons pas de preuves directes de ce bourgeonnement, c'est-à-dire que nous n'avons pas vu directement un granule noir bourgeonner, mais nous en avons d'indirectes assez valables pour l'admettre. Du reste, ce phénomène de bourgeonnement des granules est admis par la majorité des auteurs, seulement ils n'ont point fait la distinction essentielle entre les granules noirs — des spores — *qui seuls bourgeonnent*, et les fragments rouges de la substance centrale, qui deviennent de nouveaux bâtonnets par simple allongement.

Les granules noirs qui ne deviennent pas libres, mais restent intrabacillaires ne doivent pas quitter les bacilles pour recommencer la vie végétative. Dans de nombreuses observations faites sur les voiles, il nous a semblé que leur vie végétative peut recommencer dans le bâtonnet même. Quand les conditions deviennent meilleures, par exemple lorsqu'on transporte les voiles sur un milieu neuf, les granules noirs, tout en restant dans le bâtonnet, redeviennent rouges, s'allongent et recommencent à se fragmenter (v. fig. 19).

D'après nos observations le bacille ne passe pas pour se multiplier par un cycle évolutif compliqué. S'il devait passer par plusieurs phases d'un cycle, comme le décrivent beaucoup d'auteurs, on trouverait dans une colonie qui se développe toutes les formes correspondantes à ces phases et décrites par ces auteurs : poussière granuleuse, granules et bâtonnets non acido-résistants, enfin bâtonnets acido-résistants. Nous voyons qu'il n'en est rien. *Dans les colonies toutes jeunes aussi bien qu'adultes*, le phénomène de bourgeonnement des granules noirs libres mis à part, *on ne trouve que des rangées de bâtonnets acido-résistants fragmentés* comme nous l'avons décrit plus haut. Pour croire à un cycle compliqué, il faudrait admettre que toutes les phases du cycle supposé par les auteurs depuis la poussière granuleuse jusqu'au bâtonnet rouge, s'ac-

complissent en dehors de la colonie et que les bâtonnets rouges ne viennent qu'après leur mûrissement se mettre en rangées décrites plus haut, pour agrandir la colonie. Ceci est impossible à saisir et n'est pas admissible.

Dans les frottis des colonies aussi bien adultes que jeunes, colorées au Ziehl-Neelsen on trouve, à côté de la très grande majorité de bacilles acido-résistants, des bâtonnets vert-bleuâtre, non acido-résistants, généralement situés dans les couches profondes. On ne peut d'aucune façon conclure que ces bâtonnets représentent un stade plus jeune par lequel tous les bacilles doivent passer, *puisque'on ne les trouve pas dans les colonies in situ*. Il est plus probable que leur coloration dans ces frottis ne s'est pas faite pour une raison purement physico-chimique, en rapport avec la technique de la coloration seule. La preuve en est que si on recolore ces mêmes préparations, on obtient des bâtonnets rouges (v. fig. 20 et 21).

### Conclusions.

1° Le bacille de Koch coloré au Ziehl Neelsen se présente sous deux formes : *comme bâtonnet acido-résistant* et *comme granule noir libre*.

2° La multiplication du bâtonnet se fait par division directe. Cette division se fait très vite puisqu'un bâtonnet donne une colonie visible à l'œil nu en douze jours. Mais, le protoplasme se divisant plus vite que la membrane, le bâtonnet a le plus souvent l'aspect fragmenté (aspect granuleux des auteurs). Les fragments protoplasmiques colorés en rouge-bordeaux au Ziehl-Neelsen ne sont pas l'expression d'une sénilité du bacille, comme on l'admet généralement, mais d'une multiplication active. Chaque fragment donne un nouveau bacille par simple allongement. *Le bâtonnet fragmenté n'est donc pas un seul individu, mais une colonie rudimentaire*.

3° *Le granule noir libre* doit d'abord bourgeonner pour recommencer la vie végétative. Le bourgeon s'allonge et commence à se fragmenter alors que la substance centrale s'y est différenciée. La multiplication se continue ensuite comme dans le bâtonnet.



4° *Le granule noir libre a les caractères des spores.* Le fait qu'on en trouve plusieurs dans un bâtonnet ne parle pas contre cette idée, puisque chaque fragment qui deviendra un nouvel individu, peut se transformer en granule noir. Chaque granule correspond donc à un individu, un bâtonnet avec plusieurs granules n'étant pas un individu, mais une colonie rudimentaire.

5° Les granules noirs qui ne sont pas libres mais restent intrabacillaires, ne doivent pas quitter les bâtonnets pour recommencer la vie végétative. Si les conditions s'améliorent, ils peuvent, tout en restant dans les bâtonnets, s'allonger, redevenir rouge-bordeaux, et recommencer la fragmentation habituelle du protoplasme bacillaire, et avec elle sa multiplication.

6° *Les colonies adultes* développées sur le tampon de coton ont la forme de cordons pelotonnés. Ces cordons sont formés par des rangées parallèles de bacilles acido-résistants, eux-mêmes fragmentés. Dans les cordons épais, on trouve beaucoup de bâtonnets avec des granules noirs.

7° *Les voiles* sur les milieux liquides sont formés par plusieurs couches. La couche attenante au milieu est composée des mêmes rangées de bâtonnets rouges. Les couches superficielles, plus éloignées du milieu, sont composées de rangées qui se groupent en faisceaux plus ou moins épais. Ces faisceaux sont identiques aux cordons des colonies adultes développées sur le coton. Dans ces couches, on trouve de nombreux bâtonnets avec des granules noirs.

8° *La structure morphologique du bacille, ainsi que la forme et la structure de ces colonies sur le tampon de coton du milieu de Buc et dans les voiles, nous prouvent d'une façon évidente que la croissance du bacille de Koch se fait suivant sa longueur, la multiplication par division transversale directe.*

## EXPLICATION DES PLANCHES

FIG. 1. — Frottis de crachat d'un cavitair, coloré au Ziehl. On distingue nettement la substance centrale (protoplasme) et la substance périphérique (membrane). La substance centrale est fragmentée d'une façon typique. On voit que les fragments primaires deviennent de nouveaux bacilles. A gauche, en haut, trois granule noirs libres.

FIG. 2. — Culture en milieu de Buc n° 663, âgée de trente-deux jours. Coloration au Ziehl de quelques parcelles de coton tombé au fond. On voit, rassemblées d'une façon schématique, toutes les variations de transformation des fragments de la substance centrale en granules noirs. Les fragments protoplasmiques s'étant rétractés, la membrane est mieux visible.

FIG. 3. — Frottis de culture n° 644 à partir d'un exsudat pleurétique (sur Löwenstein) âgée de dix mois. Ziehl. On voit la formation des granules noirs aux dépens des fragments protoplasmiques.

FIG. 4. — Frottis de culture n° 207 (sur pomme de terre, d'un exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune) resté deux ans à la température de laboratoire, coloré au Ziehl. Granules noirs au voisinage des restes de bâtonnets rouges, membranes vides, qui s'en sont détachées.

FIG. 5. — Culture n° 739 âgée de quatre jours (exsudat de péritonite séro-fibrineuse), coloration au Ziehl de parcelles de tampon. Jeune colonie *in situ* en train de se développer. Elle est composée de quelques rangées de bacilles fragmentés, acido-résistants.

FIG. 6. — Cas n° 708 (exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune) huit jours après l'ensemencement. Ziehl. Bâtonnets acido-résistants fragmentés, en train de former des rangées suivant l'axe longitudinal, granules noirs libres et bâtonnets à granule unipolaire.

FIG. 7. — Cas n° 559 (exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune) vingt jours après l'ensemencement. Il y avait alors des colonies adultes visibles à l'œil nu, mais ici on ne voit que des colonies toutes jeunes composées de quelques bâtonnets subdivisés d'une façon typique. A gauche, en bas, la rangée a été dé faite, et on voit que la séparation des nouveaux bacilles s'est opérée au niveau des espaces entre les fragments primaires.

FIG. 8. — Culture n° 667 (exsudat séro-fibrineux de pneumothorax). *a*) Avant l'ensemencement : on voit principalement des granules noirs libres et quelques bâtonnets acido-résistants; *b*) deux jours après l'ensemencement : bourgeons rouges ou rouge-violet sortant des granules noirs libres, de différente grandeur; *c*) même préparation que *b* : amas de bourgeons; *d*) id. : les très longs bourgeons commencent à se fragmenter; *e*) cinq jours après l'ensemencement : une jeune colonie typique, composée de rangées de bâtonnets rouges, tous en train de se subdiviser.

FIG. 9. — Culture n° 732 (exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune), sept jours après l'ensemencement, on voit des granules noirs libres et deux jeunes bourgeons rouge violet, sortant des granules noirs.

FIG. 10. — Culture n° 557 (exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune). *a*) Cinq jours après l'ensemencement dans la membrane de fibrine autour du tampon, on voit des granules noirs libres et quelques rares bâtonnets rouges; *b*) sur les coupes histologiques en série on trouve de nombreux bourgeons et quelques rangées de bâtonnets subdivisés.

FIG. 11. — Culture 207 (id. que dans la figure 4). Ziehl. (Gross. : 1.800 fois). Granules noirs libres, rouges au centre, et granules noirs intrabacillaires.

FIG. 12. — Culture n° 667 (du même exsudat que n° 663), âgée de quarante-cinq jours (tampon tombé au fond du tube), les granules noirs remplacent les fragments rouge bordeaux de la substance centrale, Ziehl (gross. : 1.750 fois).

- FIG. 13. — Culture n° 663 (exsudat séro-fibrineux de pneumothorax). Douze jours après l'ensemencement : colonie *in situ* fixée sur les fils de coton (Gross. : 440 fois), Ziehl, en forme de cordon pelotonné.
- FIG. 14. — La même préparation que dans la figure n° 13. (Gross. : 1.050 fois). Quelques rangées de bâtonnets fragmentés se groupant en un faisceau très mince. C'est le faisceau indiqué par la flèche dans la figure 13.
- FIG. 15. — Culture n° 567 à la surface du Buc (en partant de la culture n° 557 sur le tampon de Buc) : voile agrandi 300 fois (Ziehl). On distingue la couche supérieure composée de faisceaux épais, et la couche inférieure plus fine.
- FIG. 16. — Culture n° 567 à la surface du Buc (en partant de la culture n° 557 sur le tampon de Buc) : très jeune voile à unique couche composée de rangées de bâtonnets rouges (Gross. : 1.000 fois).
- FIG. 17. — Id. (Gross. : 1.800 fois) ; on voit des bâtonnets subdivisés de façon typique. Regarder la flèche. On distingue le protoplasme et la membrane.
- FIG. 18. — Culture n° 565 sur Hohn (exsudat séro-fibrineux de pleurésie commune), âgée de vingt-sept jours. Frottis (Gross. : 1.800 fois). Ziehl. Courts bâtonnets formés par un ou deux fragments primaires, séparés les uns des autres par le traumatisme. La séparation s'est produite exactement au niveau des espaces clairs, entre les fragments primaires. Ces derniers, eux-mêmes subdivisés, ont l'aspect de diplocoques.
- FIG. 19. — Même culture transportée à la surface du milieu de Buc. Jeune voile composé de longs bâtonnets rouges (Gross. : 820 fois).
- FIG. 20. — Même culture et même préparation. Quelques rangées de bâtonnets isolés qui sont fragmentés. La fragmentation représente le seul mode de multiplication (Gross. : 1.800 fois).
- FIG. 21. — Même culture et même préparation. On voit comment les granules noirs intrabacillaires recommencent leur vie végétative sans sortir du bâtonnet. (Gross. : 1.800 fois). a) Gros granules noirs uniques ; b) les granules ont presque disparu, la substance centrale est rouge très foncé, mais uniforme ; c) la substance centrale commence à se fragmenter.
- FIG. 22. — Culture n° 640 (hémoculture). Frottis coloré au Ziehl, fuchsine pendant trois minutes. Les bacilles sont, en majorité, vert bleuâtre.
- FIG. 23. — Id. Coloration au Ziehl, fuchsine pendant dix minutes. On voit que tous les bacilles sont acido-résistants. A remarquer que les bacilles sont composés de un ou deux fragments primaires, les rangées étant disloquées par le traumatisme, sauf quelques-unes, indiquées par les flèches.
- FIG. 24. — Même frottis que n° 21. Bâtonnet géant, véritable fouet où la fragmentation du protoplasme et de la membrane ne s'est pas produite.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. KOCH. *Zsch. f. Tbk.*, 16, n° 2, 1910.  
 [2] NOCARD et ROUX, cités par V. Betegh dans le travail désigné par le n° 7  
 [3] KITASATTO, cité par V. Betegh, *ibid.*  
 [4] MALASSEZ et VIGNAL, V. SCHRÖN, SEMNER, CROOKSHANK, SCHÜRMAYER, ERNST, MAHER, cités par Sweany dans le travail n° 22.

- [5] V. SCHRÖN, cité par Karwacki dans le travail n° 24.
- [6] C. SPENGLER, cité par V. Betegh, *loco citato*.
- [7] V. BETEGH. *Zentralbl. f. Bakter.*, **47**, n° 5, 1908.
- [8] H. MUCH, Der Erreger. *Hbch. d. Tbk.*, Brauer, Schröder, etc., **1**.
- [9] S. BERGEL. *Zschrft. f. Tbk.*, n° **4**, 1914, p. 343.
- [10] KNOLL. *Btr. z. Kl. d. Tbk.*, **15**, 1910, p. 211.
- [11] W. M. B. WERRY, Some chemical conditions favoring the production of  
« spores » in *B. tuberculosis*.
- [12] A. MAYER, cité par Kirchenstein dans le travail n° 46.
- [13] A. CALMETTE. *La tuberculose et son bacille*, Masson, 1920, Paris.
- [14] BEZANÇON et PHILIBERT. *La Presse Médicale*, n° 3, 1926, p. 33.
- [15] FONTÈS, a) *Ultravirus tuberculeux*, Masson et Cie, Paris; b) *Die Tuberkulose*, n° 11, 1930.
- [16] A. KIRCHENSTEIN, *Ces Annales*, n° 4, 1922; p. 416.
- [17] MORTON KAHN, *Ces Annales*, n° 3, p. 259, 1930.
- [18] J. OERSKOV. *Zbl. f. Bakteriöl.*, **123**, n° 5-6, 1933.
- [19] M. KAHN et José NONIDEX. *Zbl. f. Bakteriöl.*, **128**, n° 5-6, 1933.
- [20] VAUDREMER. *Le bacille tuberculeux*, Paris. Les presses universitaires de France, 1927.
- [21] Eduard GRÖH. *Zbl. f. Bakteriöl.*, **128**, n° 5-6, 1933.
- [22] H. SWEANY. *Amer. Rev. Tbc.*, **17**, n°s 53-76, 1928.
- [23] RAVETTLAT ARMENGOL Y PLA. *Conception clinique de la tuberculose selon la bactériologie et pathologie de Ravetlat y Pla*. Publications de l'Institut Ravetlat y Pla, 1931; *Btr. z. Kl. Tbc.*, **77**, n° 1, 1931.
- [24] L. KARWACKI, Variations biologiques du virus tuberculeux. IX<sup>e</sup> Conférence de l'Union internationale contre la tuberculose. Varsovie, 1935.
- [25] LUKSCH. *Btr. z. Kl. d. Tbk.*; *Zentralb. f. Bakteriöl.*, **117**, n°s 1-3, 1930.



# CYCLE D'ÉVOLUTION DES MOISSURES SOUS L'INFLUENCE DE L'IRRADIATION MITOGÉNÉTIQUE

par ANASTASIE POTOZKY.

(Section de Biologie expérimentale.  
Institut de Médecine expérimentale, Leningrad.)

L'influence du rayonnement mitogénétique sur l'embryogénèse ne nous est connue que par les belles recherches de M. et M<sup>me</sup> J. Magrou sur les œufs d'oursin, qui ne se prêtent aux expériences que dans les stades larvaires. En reprenant l'étude de ce problème, nous avons par conséquent songé aux organismes ayant un cycle évolutif relativement court et simple, mais assez différencié pour nous fournir des données précises sur les déviations de la marche normale de l'embryogénèse dans le cas où l'irradiation aurait quelque influence.

Les moisissures nous paraissent très appropriées à ce but. Leur cycle d'évolution, tout en étant très simple et de courte durée, aboutit néanmoins à la formation d'organes sporogènes d'une architecture assez compliquée et très typique. Il y a donc lieu de parler d'une vraie morphogénèse, qu'on peut essayer d'influencer par l'irradiation à chaque moment voulu.

Nous nous sommes adressés aux espèces *Aspergillus niger* et surtout *Penicellium glaucum*.

## A. — LES MÉTHODES.

Après un séjour de douze heures dans un milieu liquide (moût de bière ou milieu synthétique), de petits groupes de spores, l'un après irradiation préalable, l'autre en guise de témoin, sont ensemencés sur des couches très minces de gélose au moût de bière, étalées sur des lames couvre-objets, formant couvercle de petites chambres humides. L'examen de la croissance des spores à travers la mince couche de gélose se fait sans aucune difficulté (fig. 1).

Dans les cas d'irradiation répétée au cours du développement de la culture, la paroi inférieure de la chambre humide

est en quartz cristallin, celle de la chambre témoin en verre de même épaisseur. Les deux chambres reposent sur un récipient muni d'un « trop-plein » et contenant le système chimique, source du rayonnement mitogénétique. Les deux cultures se trouvent par conséquent dans une ambiance strictement iden-

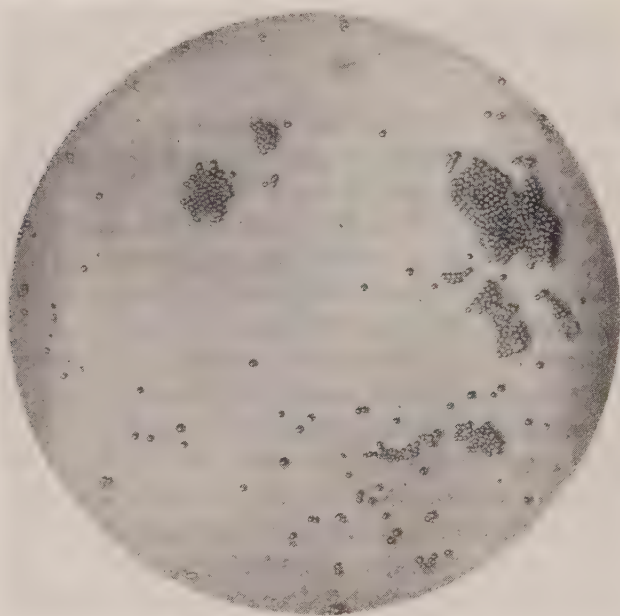


FIG. 1.

tique en tous points, sauf l'accès du rayonnement à travers le quartz (fig. 2).

Sauf quelques séries, irradiées par le cœur de grenouille, on a surtout fait usage, comme source chimique d'irradiation, de l'oxydation du sulfate ferreux (sol. N/10) par du bichromate de potassium en solution N/10 en milieu sulfurique.

#### *Germination et croissance des Hyphes.*

Les spores des deux espèces sont soumises à l'irradiation par petits lots, après un séjour préalable de douze heures dans le moût de bière.

## A. Irradiation par le système chimique (dix à douze minutes, 16 lots).

HEURES écoulées depuis l'irradiation	EFFETS	
	Induction	Témoin
15. . . .	Rupture de la membrane (12 lots).	Aucun changement.
16. . . .	Rupture de la membrane dans les 4 lots restants, bourgeons des hyphes : 2 à 3 unités de longueur du micromètre.	Rupture de la membrane dans 8 lots.
18,5. . .	Hyphes de 6 à 9 unités de longueur.	Rupture dans les lots res- tants, hyphes de 4 unités de longueur.

B. Dans une autre série, nous avons poursuivi l'accélération de la germination des spores d'une façon plus détaillée.

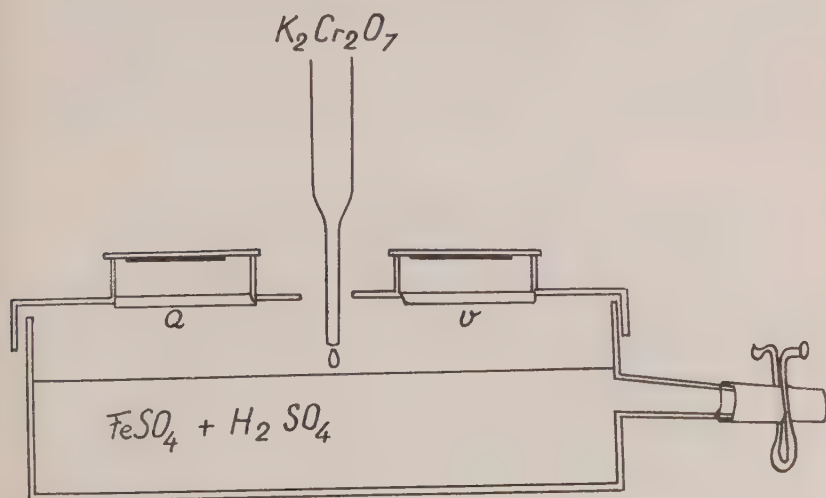


FIG. 2.

Les spores de *Penicillium glaucum* sont mises en moût de bière à partir de 9 heures du soir jusqu'à 9 heures du matin. I goutte renfermant des spores est irradiée pendant dix minutes (*cœur de grenouille*), une autre à côté sert de témoin.

INDUCTION		TÉMOIN	
Nombre de spores en germination	Longueur des hyphes	Nombre de spores en germination	Longueur des hyphes
12 à 15 heures : 0. . .		0	
16 heures : 15, 15, 18, 15, 15, 18, 21, 16, 16, 16 .		0	
17 heures : 42, 39, 37, 36, 36, 41, 38, 38, 38, 38 .		0	
18 heures : 57, 55, 59, 58, 57, 59, 60, 68, 59, 60 .	9 à 0,1; 4 à 0,1; 9 à 0,1; 4 à 0,1; 1 à 0,2; 3 à 0,1.	Gonflement de spores.	
19 heures : 99, 100, 100, 100, 87 . . . . .	0,1; 0,2; 0,2; 0,3; 0,2 (en moyenne).	Germination de la moitié des spores (approximativement).	
28 heures. . . . .	0,7; 0,9; 1,2; 0,9; 0,9 (en moyenne).		
28 heures. . . . .	1,7; 1,8; 1,5; 1,9; 1,7 (en moyenne).		0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,6 (en moyenne). 1,3; 1,4; 1,2; 1,4; 1,4 (en moyenne).

Après l'irradiation, les II gouttes, étalées sur une mince couche de gélose, sont transportées dans une chambre humide et soumises à l'examen que l'on poursuit jusqu'à la vingthuitième heure. On a choisi pour l'examen, dans chaque portion, 12 lots contenant chacun 100 spores (approximativement).

## B. — CROISSANCE

### ET CLOISONNEMENT DES MYCÉLIUMS (fig. 3 et 3 bis).

Les cloisons apparaissent, dans certaines cultures, au cours de la troisième journée après l'ensemencement. En procédant à l'irradiation deux fois par jour à partir du moment de la germination des spores, on obtient une accélération très prononcée de l'apparition des cloisons.

Nous reproduisons les résultats de trois séries d'expériences.

NOMBRE de lots	APPARITION DES CLOISONS (heures [moyenne])	
	Induction	Témoins
N° 14. . . . .	59	69
N° 8 . . . . .	53	62
N° 6 . . . . .	54	66

#### Cas individuels de la dernière série :

Induction. . . . .	57	52	54	54,5	55	53
Témoin. . . . .	62	70	64	68	66	66



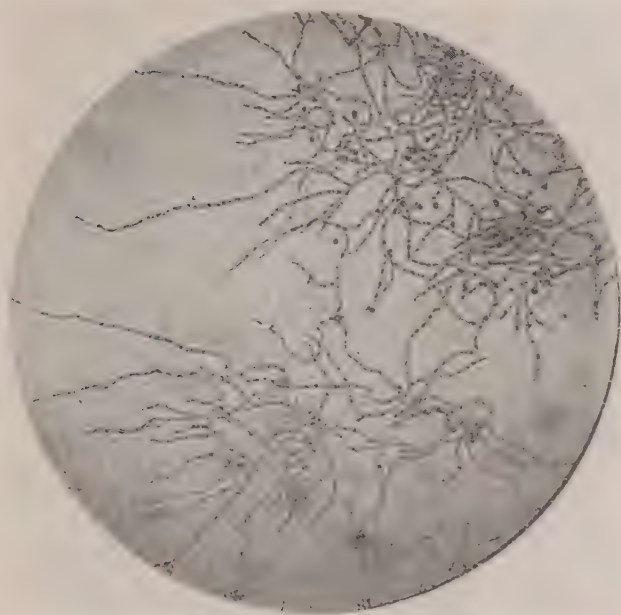


FIG. 3.

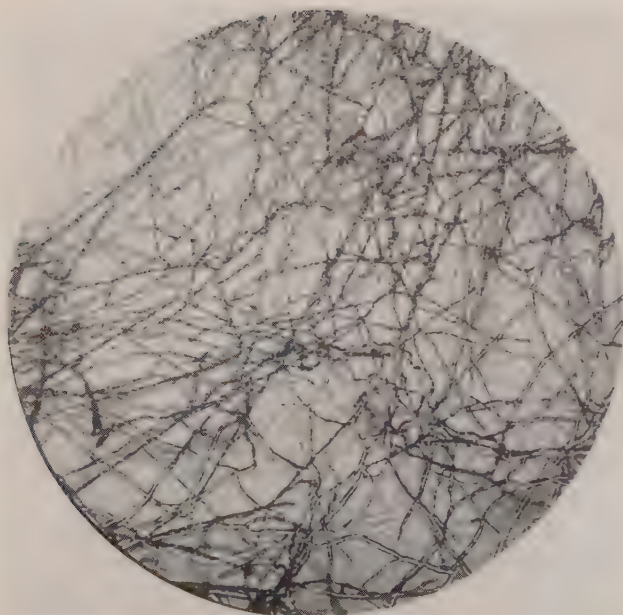


FIG. 3 bis.

C'est un fait bien connu que les spores voisines dirigent les ramifications de leurs hyphes dans des directions opposées et que, par conséquent, une culture de moisissures affecte toujours une forme ronde bien régulière, à deux zones très distinctes, celle de la périphérie plus transparente et l'autre du centre opaque ou blanchâtre, beaucoup plus épaisse, une partie des hyphes se redressant en direction verticale.

La forme régulière des cultures nous permet de mesurer leur diamètre à l'aide d'un micromètre. En prenant comme point de départ deux jeunes cultures de même grandeur, l'une comme



FIG. 4.

témoin, l'autre irradiée au cours de sa croissance, on parvient à constater des différences régulières de leur grandeur même à l'œil nu.

L'ensemencement des cultures se fait dans ces cas par une piqûre avec une aiguille chargée d'une petite quantité de spores. Nous avons eu recours aussi à un micromanipulateur, en tâchant de prendre un nombre fixe de spores. Pourtant, nous n'avons pas eu de résultats avec une seule spore isolée.

Le lendemain d'une telle piqûre, on voit se former sur la gélose de petites taches rondes qui affectent, à un faible grossissement, la forme d'une rosette. On les assortit en paires, soigneusement mesurées et, en protégeant l'une des deux cultures par une lame en verre, on procède à l'irradiation répétée deux fois par jour (système chimique).

Nous donnons nos résultats dans le tableau suivant (I = irradié; C = témoin).



FIG. 3. — Induction.



FIG. 5. — Témoin.

	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C
Diamètres des paires le lendemain de la piqûre (avant l'irra- diation) . . . . .	0,3	0,3	0,4	0,42	0,45	0,45	0,4	0,4	0,3	0,3	0,51	0,5	1,3	1,4	2,3	2,2		
1 jour après . . . . .	2,4	1,3	2,5	1,4	2,9	1,6	2,6	1,9	2,4	2,0	2,7	2,0	4,5	3,2	6,2	4,7		
2 jours . . . . .	8,0	5,0	7,5	5,8	9,5	8,4	6,9	4,1	6,8	4,3	7,3	4,5	7,4	5,9	10,1	7,9		
3 jours . . . . .													13,1	10,3	14,8	10,0		

### C. — FRUCTIFICATION DES MOISSURES.

Nous avons suivi le développement de l'appareil conidien du *Penicillium*. Les esquisses semi-schématiques en donnent une idée (fig. 4).

Dans les cultures sur gélose, qui ont été exposées à l'irradiation



FIG. 61. — Culture irradiée, formes de conidiophores touffues, les éléments ne sont pas dénombrables.

deux fois par jour, le cours de la fructification est influencé au point de vue du rythme et, surtout, de la morphologie du processus.





FIG. 6 T.



FIG. 6 T bis.

FIG. 6 T et 6 T bis. — Conidiophores témoins de deux cultures différentes.

Nous avons enregistré, dans sept séries, le moment de l'apparition du gonflement qui précède la formation du conidiophore et la formation des conidies.

	INDUCTION	TÉMOIN
Gonflement des hyphes (heures).	30, 32, 30, <u>31</u> , 31, 31, 31	38, 38, 39, <u>40</u> , 39, 39, 39
Début de la formation des phialides et des spores. . .	41, 43, 40, 42, 42, 44	58, 58, 59, 60, 57, 58

Il y a donc une accélération notable du processus comme résultat de l'irradiation (fig. 5).

Mais c'est surtout la morphologie des conidiophores et des conidies qui mérite toute notre attention.

Le nombre des éléments, qui forment en leur totalité le pinceau de *Penicellium*, est généralement accru jusqu'à l'impossibilité de les dénombrer, le tout formant une grappe d'une forme irrégulière et touffue. La longueur moyenne des phialides diminue en même temps notablement en comparaison avec les témoins.

Sur 129 lots examinés, le nombre des éléments basaux était de 2 à 4 au maximum dans les témoins, et impossible à dénombrer dans 47 lots d'induction.

Les dimensions des phialides ont été les suivantes (fig. 7) :

INDUCTION			TÉMOIN		
0,7-0,9	0,5-0,7	0,4-0,3	0,9-1,2	0,7-0,9	0,5-0,7
30 lots	52 lots	47 lots	60 lots	40 lots	29 lots

Enfin, les spores, provenant de ces fructifications anormales, se sont montrées stériles, elles n'ont pas germé dans les milieux nutritifs.

En jetant un coup d'œil sur l'ensemble de nos résultats, on ne manquera pas d'être frappé par l'analogie profonde avec ceux de M. et M<sup>me</sup> Magrou, de Maxia et de Zirpolo concernant les œufs et les larves d'oursin. L'accélération notable du développement dans les premiers stades, provoquée d'après les deux derniers auteurs par l'irradiation mitogénétique, est suivie par des déviations marquées de l'embryogénèse normale qui aboutit aux formes monstrueuses des *plutei*. L'analyse détaillée de la déviation, faite par M. et M<sup>me</sup> Magrou, semble prouver que

c'est en premier lieu l'hyperplasie des éléments du mésenchyme qui est la cause de l'anomalie de l'embryogénèse, de la difformité du squelette et de la configuration générale. Une hyperplasie analogue se produit aussi, comme nous venons de le voir, dans l'embryogénèse des appareils fructifères des moisissures.

Pour bien pénétrer ce phénomène, il s'agirait avant tout de se décider sur l'alternative suivante : s'agit-il bien d'une action purement mitogénétique, c'est-à-dire d'une stimulation pure et simple de la multiplication cellulaire? Ou n'y aurait-il pas

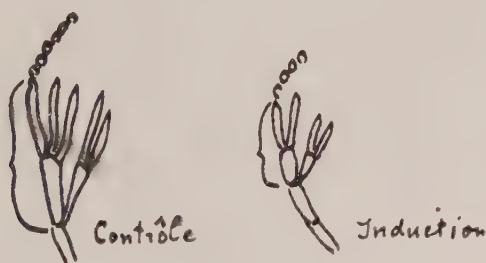


FIG. 7.

plutôt lieu d'admettre une altération profonde de la constitution intime des cellules irradiées qui serait alors, indépendamment de l'action stimulatrice sur les divisions cellulaires, la cause de l'anomalie du développement?

Certaines données toutes récentes, encore inédites, de notre laboratoire, semblent plaider pour le deuxième terme de l'alternative. Nous espérons pouvoir revenir sur cette question.

## ÉTUDE SUR L'IMMUNITÉ CHEZ LES PLANTES

par I. GHEORGHIU.

*(Laboratoire de Bactériologie, Faculté de Médecine de Jassy.)*

L'importance de l'étude de la pathologie végétale a été mise en évidence par E. Smith. Par ses remarquables recherches, il a posé les véritables bases scientifiques de la phytopathologie, science qui a gagné lentement du terrain et attiré l'attention des chercheurs.

Dans tous les Instituts de recherches agronomiques, on connaît aujourd'hui la plupart des maladies du règne végétal. Les expériences et les observations ont conduit à la conclusion que, au point de vue de la maladie, les différences entre les règnes sont minimales et le résultat final à peu près le même. Mais si la phytopathologie est aujourd'hui étudiée à fond, il n'en est pas de même de l'immunité chez les plantes.

La possibilité d'immuniser une plante contre une maladie quelconque est encore contestée, en principe, par la majorité des phytopathologues, qui n'admettent pas le phénomène de l'immunité dans le règne végétal, en raison des grandes différences anatomo-physiologiques qui existent entre les deux règnes. Parmi d'autres objections sérieuses, il y a aussi celle-ci que les plantes n'ayant pas le même système circulatoire que les animaux, système qui serait le centre des principaux phénomènes de l'immunité, ces phénomènes ne pourraient pas se produire chez elles.

Une simple observation, prise dans le domaine de la phytopathologie, nous permet de répondre en ce qui concerne les objections émises plus haut : si à une plante on inocule dans une région quelconque de la tige une certaine dose d'une culture microbienne virulente, toute la plante sera envahie par l'élément pathogène en un laps de temps déterminé.

Prenant comme point de départ ces observations et par



analogie avec ce qui se passe dans le règne animal, nous nous sommes demandé si les plantes ne pourraient pas réagir contre l'agent infectieux par leur propre système de défense et, ainsi, si l'on ne pourrait pas prévenir et guérir l'infection par vaccination au moyen de l'antigène spécifique, comme c'est le cas dans le règne animal.

Nos observations se basent sur le fait expérimental que si, chez une plante, on provoque le cancer par l'inoculation de *B. tumefaciens*, on peut démontrer jusqu'à l'évidence l'infection totale de la plante, quelle que soit la région inoculée et d'autre part, qu'en soignant cette plante cancéreuse avec un vaccin spécifique, il apparaît une véritable immunité antitumorale, bien que chez la plante il n'existe pas de circulation pareille à la circulation sanguine des animaux.

La question de l'immunité anticancéreuse des plantes a été longtemps étudiée par nous sur un grand nombre de plantes et les résultats de ces expériences ont été publiés ici-même (1) en 1933.

La pathologie végétale est aujourd'hui rangée à côté de la pathologie animale et l'immunologie végétale offre un champ très vaste aux chercheurs.

Il est évident qu'à ce point de vue il existe une analogie d'effets entre les réactions qui se produisent chez les plantes infectées ou vaccinées et celles qui se produisent chez les animaux. Les réactions vitales du règne animal et celles du règne végétal sont soumises à des lois identiques. La relation qui existe entre les réactions de défense des animaux en général et celles des plantes est si étroite que l'on peut dire, sans exagération, qu'il n'y aurait pas de pathologie générale, si l'on ignorait la pathologie végétale.

Les résultats expérimentaux de phyto-immunité obtenus sur le *Pelargonium zonale* nous ont conduit à la ferme conviction que, dans d'autres maladies des plantes, on pourrait aussi déterminer une immunité active. Ce fait, nous avons pu le prouver encore une fois sur les plantes de géranium infectées avec un parasite de l'ordre des Mucorinées.

Mais, si le fait de la phyto-immunité acquise peut être consi-

(1) Ces *Annales*, 51, 1933, p. 535.

déré comme certain, son mécanisme est peu étudié et surtout mal interprété.

Les plantes qui nous servent pour l'étude du cancer expérimental nous ont été apportées infestées par des pucerons verts (Aphides) qui semblent jouer un rôle dans la transmission de la maladie.

Lentement, il apparaît, sur la tige et surtout sur les feuilles

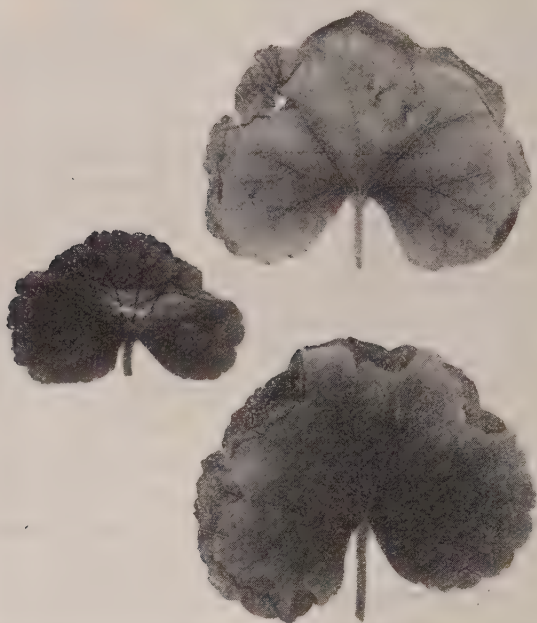


FIG. 1. — Différents aspects de feuilles malades.

un fin duvet, après quoi les plantes commencent à manifester des signes de souffrance. Elles ne se développent plus normalement, perdent leur chlorophylle, se dessèchent et tombent.

En examinant avec plus d'attention les causes de cette maladie, on a observé un mycélium qui apparaît par la transparence des cellules de la feuille et qui se trouve entre les cellules et dans leur intérieur lorsque la maladie est plus avancée. La maladie se présente sous diverses formes offrant

un polymorphisme très varié. Ses premières manifestations apparaissent sur les feuilles sous la forme d'un duvet fin, qui couvre la tige et la feuille d'une manière uniforme. Ce duvet disparaît avec le temps, mais la plante pousse lentement, elle fleurit difficilement en donnant de petites fleurs décolorées et



FIG. 2. — Plante avec les feuilles déchlorophyllées et tachetées.

avec une évolution très lente. Dans les phases les plus avancées, la maladie se manifeste d'abord au niveau de la feuille qui perd sa chlorophylle, puis se dessèche. La perte de la chlorophylle ne se fait pas d'habitude d'une manière uniforme, mais très variée : dans certains cas, la feuille perd sa chlorophylle de place en place et la partie privée de chlorophylle devient d'abord blanche. A mesure que la déchlorophyllisation avance, il se produit au point initial un changement de couleur, ui

varie de la couleur blanche, au jaune-beige foncé vers le brun. Les parties atteintes se dessèchent complètement et tombent aussitôt qu'on les touche, mais le reste de la feuille reste en apparence sain. D'autres feuilles présentent des irrégularités sur leur surface, elles perdent leur chlorophylle et cette partie ainsi morte tombe, laissant le reste pour un certain temps avec la chlorophylle non altérée. D'autres fois, la déchlorophyllisation de la feuille atteinte va de la périphérie vers le centre, ou seulement à une partie du bord; en d'autres cas, la feuille commence à se dessécher rapidement tout autour du bord et la mort de la feuille survient dans un délai si court que la déchlorophyllisation n'a pas le temps de se produire. L'affection envahit vite toute la feuille qui se dessèche complètement et tombe. En d'autres cas, les feuilles perdent la chlorophylle et deviennent complètement blanches, après quoi apparaissent des taches brun foncé; finalement, la feuille se dessèche et tombe. Des feuilles nouvelles n'apparaissent plus, la plante tout entière manifeste des signes de souffrance et finit par se faner et se dessécher.

Si l'on examine avec une loupe, par transparence, les feuilles de la plante infectée, on constate que la plante présente des lésions qui alternent avec les couches normalement colorées. Dans une coupe faite à travers une feuille atteinte de la maladie, on peut voir comment la forme mycélienne du parasite envahit de place en place le tissu de la feuille qu'il déchlorophyllise et où elle se trouve en partie dans les cellules, en partie à l'extérieur des cellules. La pénétration du mycélium dans le tissu de la feuille a pour résultat une multiplication du parasite et, comme lésion des cellules, la pycnose des noyaux, leur éparpillement dans la masse protoplasmique, puis leur disparition. D'autre part, le protoplasma se contracte et brunit, ce qui signifie que le parasite sécrète une toxine qui tue les cellules.

Dans beaucoup de cellules, on peut observer des phénomènes de protection en ce sens que, même avant que le parasite ne pénètre dans la cellule, le noyau devient volumineux avec tendance à la fragmentation, le protoplasme prend un aspect granuleux et la chlorophylle ne disparaît pas, ce qui indique que, de la part des cellules, il s'exerce une résistance et une défense contre le parasite et la toxine qu'il sécrète.



L'infection naturelle et expérimentale s'opère par le mycélium qui, dès qu'il est fixé aux cellules épidermiques, sécrète une toxine qui tue d'abord celles-ci, puis les éléments du parenchyme. Elle se manifeste par la contraction et le brunissement du protoplasme. Le parasite a été identifié à *Sclerotinia*, forme de fructification conidienne, de type *Monilia*. *Sclerotinia* est un parasite très résistant, grâce à ses sclérotés qui ont le même rôle que les spores des bactéries et qui permettent de l'isoler très facilement à l'état de pureté sur les milieux de culture. La technique pour l'isolement du parasite est facile : on prend une feuille contaminée que l'on met dans de l'alcool à 70° pendant deux à cinq minutes, après quoi on la lave avec de l'eau stérilisée pour enlever l'excès d'alcool et on l'étend sur des milieux de culture solides, tels que la gélose simple. Après l'ensemencement, on porte à l'étuve à 37°. Au bout de deux ou trois jours, quelquefois plus tôt, apparaissent sur le milieu de culture les formes mycéliennes du parasite, qui lentement envahissent toute la surface du milieu et s'étendent même sur le verre.

La culture du parasite présente différentes colorations selon qu'elle est récente ou ancienne, allant de la transparence qui s'observe pendant les premières heures de la culture, à la teinte blanc mat, puis grise, pour passer ensuite du brun rougeâtre au brun foncé.

Nos recherches sur cette maladie font suite à notre travail : « L'immunité anticancéreuse des plantes ». Nous les avons poursuivies pour nous mieux documenter sur l'immunité dans le règne végétal.

L'isolement du *Sclerotinia* nous a aidé à préparer un vaccin anti-*Sclerotinia*. En réalité, nous avons adopté le procédé déjà utilisé pour la préparation du vaccin anti-*tumefaciens*, employé pour vacciner les plantes cancérisées. Le parasite est cultivé sur gélose simple ; après qu'il s'est développé suffisamment, on le racle, on l'émulsionne avec du sérum physiologique, on aspire l'émulsion avec des pipettes stérilisées et on la mélange avec une solution de formol à 2 p. 100, après quoi on la met pendant cinq à huit heures au bain-marie à 50°. Au sortir du bain-marie, on la centrifuge pour séparer la partie liquide de la partie microbienne ou bien on laisse cette dernière se déposer pendant

quelques jours. On rejette le liquide qui contient la solution de formol et on le remplace par du sérum physiologique stérile. C'est le vaccin que nous utilisons.

On soulève légèrement l'épiderme sur une surface de 2 à



FIG. 3. — En haut une feuille malade.  
En bas une feuille saine après l'application du vaccin.

3 centimètres, tout autour de la tige d'une plante malade et immédiatement on couvre cette partie de manchons d'ouate stérile imbibée de vaccin *antisclerotinia*. Quelques semaines après, on peut observer les résultats de cette méthode de vaccination. Les plantes ainsi traitées commencent à produire des feuilles nouvelles, refleurissent, reprennent leur cours évolutif normal, ce qui ne s'observe pas chez les plantes malades non

vaccinées. Dans certains cas, chez les plantes traitées, on observe les phénomènes d'intolérance vis-à-vis de l'action du vaccin. Cette intolérance se manifeste comme une véritable



FIG. 4. — Aspect d'une plante après l'application du vaccin.

intoxication, comme celle qu'on observe parfois chez les animaux à la suite d'applications de vaccins dans un but préventif ou curatif et qui doit être interprétée comme le résultat d'une trop grande absorption d'antigène. Dans ce cas, la plante

manifeste une sorte de souffrance avec tendance à se flétrir, ses feuilles perdent en partie leur chlorophylle, mais après un certain temps elle recouvre son état normal. Ces phénomènes ont été aussi observés par d'autres chercheurs, surtout dans les vaccinations passives, et ils ont été interprétés comme étant des phénomènes anaphylactiques, mais nous pensons que dans l'immunologie végétale il s'agit de phénomènes toxiques. Si nous observons, soit par transparence, soit sur des coupes, une feuille de la plante vaccinée, nous voyons que le parasite n'a pas disparu, mais qu'il se trouve parmi les cellules de la feuille. Il est même encore viable, car on peut le cultiver sur les milieux habituels. S'il n'exerce plus son action toxique sur la plante, cela signifie que par la vaccination le parasite a perdu la faculté de produire la toxine, ou que l'antitoxine sécrétée par la plante vaccinée neutralise la toxine produite par le parasite. En conséquence, la maladie déterminée par le *Sclerotinia* serait une maladie toxique entraînant d'abord la perte de la chlorophylle et la mort totale de la plante.

Cette immunité n'est pas de longue durée; six à huit mois après avoir été vaccinée, la plante commence de nouveau à manifester des signes de la maladie, surtout au niveau des feuilles, mais l'évolution est très lente.

Bien que l'immunité chez la plante soit certaine à la suite des inoculations, les éléments qui la produisent n'ont pu être mis en évidence. Tous les moyens employés pour déceler les anticorps sont restés infructueux.

L'immunologie végétale offre aujourd'hui un champ très vaste aux recherches d'immunologie générale. A ce point de vue, il existe une parfaite analogie d'effets entre les réactions de défense des plantes et celles des animaux. Il reste à déterminer le mécanisme des réactions d'immunité de la plante.



## BASES EXPÉRIMENTALES DE LA TRANSFUSION DES LEUCOCYTES (1).

par J. HANAUSEK,

(*Institut d'Hygiène publique de Prague, section de diagnostic microbiologique. Directeur D<sup>r</sup> DRBOVHLAC, chef de la section.*)

Pour recueillir des leucocytes du sang, nous nous servons de récipients spéciaux à centrifuger, récipients dont la partie moyenne (un peu au-dessous de la mi-hauteur) se rétrécit en un tube étroit dans lequel les leucocytes se déposent, formant une couche épaisse (voir *Progrès médical*, 1933, n° 37, et *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1935, p. 817). Nous centrifugeons le sang à deux reprises. Après la première centrifugation, on voit la surface libre de la couche des hématies au-dessus de la partie rétrécie. On refoule ensuite une partie des hématies, jusqu'à ce que le niveau en question atteigne le tube et on soumet le récipient à une nouvelle centrifugation. Les leucocytes se sédimentent alors dans la partie rétrécie.

Le fait que nous ne pouvons savoir d'avance la situation de la surface libre de ces hématies, après la première centrifugation est dû à plusieurs causes. En tout premier lieu, non seulement le nombre des hématies est différent chez diverses espèces d'animaux, mais il varie aussi chez le même individu suivant sa nourriture, son genre de vie, etc. Il faut aussi mentionner qu'en prélevant le sang à l'aide d'une aiguille creuse et en le versant dans une solution de citrate de soude, nous obtenons des dilutions et des pourcentages d'hématies très variables, suivant que la quantité de sang prélevée est plus ou moins grande. (On obtient une dilution exacte du sang par la solution de citrate de soude en prélevant le sang à l'aide d'une seringue double, inventée par l'auteur et décrite dans les

(1) Ce travail a été effectué grâce à une subvention du Ministère de l'Instruction publique tchécoslovaque.

articles « Bases expérimentales de la transfusion des leucocytes III et VI. ») On ne doit pas oublier non plus que plus la centrifugation est **prolongée** et plus elle est rapide, plus le **volume des hématies diminue (bien que ce phénomène ne se produise que jusqu'à une certaine limite)**. **De même**, la température à laquelle s'effectue la sédimentation du sang exerce une influence (la vitesse de celle-ci augmente à une température plus élevée). Le rapport entre le volume des hématies et celui du plasma dépend donc de plusieurs facteurs imprévus.

J'ai essayé aussi d'élaborer une méthode permettant d'obtenir la sédimentation des leucocytes dans la partie rétrécie du vase, ceci après la première sédimentation, mais je n'ai pas réussi à avoir un résultat positif. Déterminer d'avance, à l'aide d'un hématocrite, le pourcentage des hématies et calculer ensuite la quantité de sang nécessaire pour que les leucocytes se déposent dans la partie rétrécie du récipient, est une méthode lente et donnant des résultats peu précis.

J'ai entrepris aussi des expériences avec un flotteur spécial, creux (en bois ou en métal) qui se meut librement comme un piston (hauteur de 4 centimètres à peu près) dans un récipient cylindrique à centrifuger (hauteur du récipient 11 centimètres environ, diamètre d'à peu près 4 centimètres). Le flotteur en question était percé par un canal vertical dont le diamètre mesurait 1 centimètre environ. Le poids du flotteur a été établi de façon à pouvoir le maintenir à la limite des hématies et du plasma. Dès la première centrifugation, les leucocytes devaient se sédimenter, en une couche épaisse, dans le canal mentionné ci-dessus. Les expériences, bien qu'au point de vue théorique on pouvait s'attendre à de bons résultats, n'en ont pas donné, ceci par suite de grosses difficultés d'ordre technique.

Il est donc indispensable d'abaisser graduellement le niveau des hématies après la première centrifugation. Au cours de cette opération, un certain nombre de ces éléments adhèrent encore pendant quelque temps aux parois du récipient, de sorte qu'on ne peut pas bien voir le niveau de leur abaissement. L'appareil représenté sur la fig. 1 permettant d'observer le vase qui contient le sang, vase éclairé par une fente, et d'aspirer en même temps les hématies à l'aide d'une seringue, remédie à l'inconvénient en question.

L'appareil se compose d'une caisse en bois *A* longue de 55 centimètres, large de 12 centimètres et haute de 10 centimètres, peinte à l'intérieur en noir mat. A travers cette boîte (dans la direction marquée par une flèche) on observe le vase *B C*. Les yeux de l'observateur sont protégés contre l'effet troublant de la lumière extérieure d'une part par la caisse *A*, d'autre part par l'étoffe noire fixée sur le support *D* (l'étoffe n'est pas représentée sur la figure afin de rendre celle-ci plus

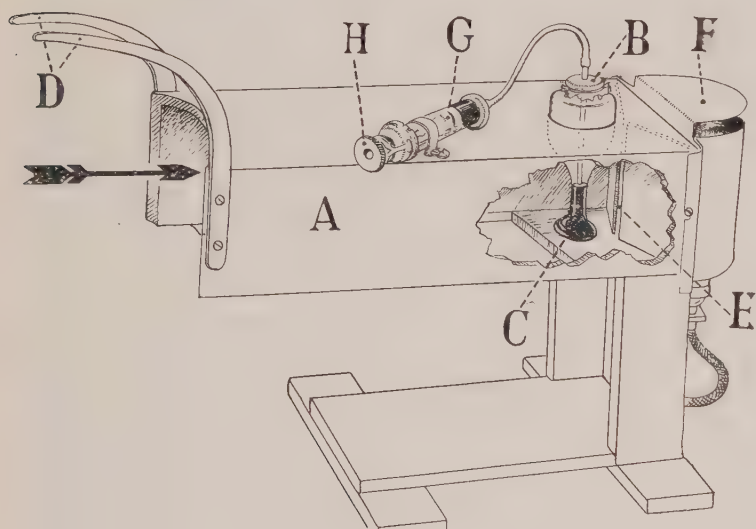


FIG. 1.

démonstrative). Une partie de la paroi latérale *A* n'est pas dessinée en vue de montrer l'intérieur de l'appareil (la fente *E* et le vase *B C*), en réalité cette paroi, elle aussi, est pleine. Le vase est éclairé par la fente *E* à l'aide d'une ampoule placée dans la boîte *F*. Pour simplifier l'installation, on peut remplacer cette ampoule par n'importe quelle lampe placée derrière la fente. Les hématies sont aspirées à l'aide de la seringue *G* fixée à l'appareil. On peut facilement la retirer de celui-ci. La seringue est munie d'une vis *H* qui permet de faire mouvoir lentement le piston dans les deux directions. Si le vase *B C* a un volume de 55 cent. cubes environ celui de la seringue doit être de 5 cent. cubes à peu près. Quant à l'aspiration des leucocytes

ou au refoulement de ces éléments du vase où ils se trouvent après la seconde centrifugation à l'aide d'un piston refoulant spécial (*loc. cit.*), il est préférable d'effectuer ces opérations à une lumière tombante diffuse, directement dans un local plutôt que dans l'appareil décrit ci-dessus, puisque la lumière qui passe ne permet pas de voir distinctement la limite entre la couche de leucocytes et les hématies.

Il convient de ne pas laisser longtemps dans le récipient les leucocytes et les plaquettes sanguines une fois centrifugés, afin de pouvoir, peu après la seconde centrifugation, les aspirer et les mélanger à une petite quantité de plasma et d'hématies. La compression des leucocytes exerce une influence nocive sur leur vitalité, notamment sur leur aptitude à absorber l'oxygène et à éliminer les produits de désagrégation. Il n'est pas davantage recommandé, après la première centrifugation, de laisser reposer le sang pendant un laps de temps plus ou moins long, car dans ce cas, la mince couche de leucocytes commence à se recroqueviller.

L'emploi de la seringue pour l'aspiration des hématies est semblable à celui d'un piston dans le vase à centrifuger, décrit dans mon article « Bases expérimentales de la transfusion des leucocytes, VIII (fig. 3) ». La seringue F a les avantages de ce piston, et, de plus, elle n'est pas soumise à l'action de la force centrifuge. Elle a pourtant ce désavantage que les hématies, une fois aspirées par la seringue, ne sont plus soumises à une deuxième centrifugation, ce qui entraîne la perte des leucocytes restés parmi elles. Pratiquement, on peut cependant, dans la plupart des cas, n'en pas tenir compte.

Manipulant avec de petits vases [de 1 à 2 cent. cubes de volume ou même moins encore (1)], on peut se servir de l'appareil décrit plus haut, à la condition de rendre la fente E plus étroite à l'aide d'un écran approprié.

Il nous reste encore à signaler la nouvelle nomenclature des doses de leucocytes qui nous semble convenir à la réalisation pratique de la transfusion. Comme « *unité leucocytaire* » servant de base à toutes les évaluations, nous considérons le nombre

(1) Les vases en question seront décrits dans mon travail « Bases expérimentales de la transfusion des leucocytes, IX ».



de leucocytes contenus en moyenne, dans 1 cent. cube de sang veineux d'un donneur adulte sain. Par écrit, nous désignons cette unité par : « *leu* ». Nous employons la même désignation dans le langage parlé, afin de la rendre plus simple, on pourrait cependant désigner l'unité en question, par « petit leu ». Si on dit « *37 leus de lapin* » ou « 37 unités leucocytaires », cela désigne, conformément à la définition donnée ci-dessus, la quantité de leucocytes contenue dans 37 cent. cubes de sang de lapin. L'expression « en moyenne » incluse dans la définition de l'unité, signifie dans le cas du sang humain 7.000 leucocytes de formule leucocytaire normale dans 1 cent. cube. Un « leu » humain renferme donc 7 millions de leucocytes. Étant donné qu'en général, il est d'usage de signaler le nombre de leucocytes dans 1 millim. cube, on peut aussi adopter un terme spécial pour  $1/1.000$  de « leu » (ce qui correspond à 1 millim. cube de sang) et le désigner par le nom de *micro-leu* (cette dernière unité a peu d'importance pratique). 1 micro-leu renferme donc chez l'homme 7.000 leucocytes, chez le lapin 8.900, et chez le cheval 10.300.

Par contre, c'est la « grande unité leucocytaire » qui est appropriée à l'usage pratique (notamment en ce qui touche l'homme et les grands animaux). Cette unité peut être définie comme le nombre moyen de leucocytes contenu dans 1 litre de sang veineux d'un donneur adulte sain. Nous la désignons par écrit sous le nom de « *Leu* » dans le langage sous celui de « *grand leu* » (l'emploi de l'adjectif dans ce cas est obligatoire).

Enfin, il me semble utile d'introduire, pour l'usage pratique, la notion de « *dose leucocytaire corporelle* ». Nous adoptons pour cette dose la désignation « *C-leu* ». Il s'agit, dans ce cas, du nombre global des leucocytes renfermés dans le sang d'un individu, donné à l'état normal. Pratiquement, nous évaluons la quantité de sang d'après le poids du corps. Pour des buts pratiques, on peut admettre, en se basant sur les données assez divergentes de différents auteurs, qu'à 1 kilogramme de poids vif correspond 80 cent. cubes de sang ou 80 « *leus* ». La dose leucocytaire corporelle (« *C-leu* ») serait donc, par exemple, pour un homme qui pèserait 60 kilogrammes, de 4, 8 « leu » à peu près, tandis que chez un enfant pesant 15 kilogrammes, elle ne serait que de 1, 2 « leu ». Si le poids vif est de 70 kilo-

grammes, le sang du sujet en question renfermera une « dose leucocytaire corporelle » égale à 5, 6 « *Leu* », c'est-à-dire à peu près 40 milliards de leucocytes. La dose en question est donc proportionnelle au poids du sujet. Elle n'est donc qu'une unité relative et schématique. Il faut aussi mentionner qu'il s'agit d'une valeur très approximative, notamment s'il s'agit d'un malade amaigri. Pour cette raison, il est préférable d'employer le terme « dose » corporelle, au lieu d'« unité ». « *C-leu* » nous donne pourtant une idée plus précise sur l'effet thérapeutique possible que l'unité « *leu* » puisque la transfusion d'un « *C-leu* » signifie que le malade reçoit autant de leucocytes qu'il en a à l'état normal dans le sang. Si on administre 1 « *Leu* » à un enfant dont le poids est de 15 kilogrammes et si on introduit la même unité dans le corps d'un homme pesant 60 kilogrammes, le premier reçoit par ce fait 1 « *C-leu* » tandis que l'adulte ne reçoit dans ce cas que le quart de son « *C-leu* ». La valeur de « *C-leu* » est donc individuelle, et même cette valeur individuelle varie au cours des temps. Plus le sujet prend de l'embonpoint, plus sa dose leucocytaire « *C-leu* » augmente, de sorte que — *ceteris paribus* — il a besoin d'une défense leucocytaire toujours grandissante.

Pour simplifier le problème, on peut aussi estimer approximativement la dose corporelle d'après la longueur du corps, ou même, l'âge de l'enfant (et, d'après les trois degrés d'obésité et du développement du squelette, à l'aide d'un tableau spécial). Je crois que ramener la dose leucocytaire au kilogramme de poids, serait moins démonstratif que de se servir de la notion de la dose leucocytaire corporelle.

Pourtant, si nous voulons établir des valeurs précises, il ne reste qu'à compter le nombre des leucocytes et à les décompter par catégories (ou tout au moins, d'évaluer leur nombre à l'aide de l'hématocrite) dans chaque portion de leucocytes destinée à la transfusion, ainsi qu'à établir le volume de cette dose. En pratique, cette opération ne serait pourtant nécessaire que dans des cas exceptionnels. Il faut enfin mentionner ce fait que les unités « *leu* » et « *Leu* », comme on le voit par la définition de celles-ci, se rapportent au sang du donneur, tandis que la dose « *C-leu* » se rapporte au corps du receveur.

## ERRATA (1)

Article de Matao Suematsu (ces *Annales*, 56, avril 1936, p. 427):

Page 429, paragraphe 2, dernier mot, lire *Lo*, au lieu de *L+*.

Page 431, dernière ligne, avant le dessin, après : toxicité, ajouter : *de la toxine* (contenue dans ...).

Page 432, dernier paragraphe, avant III, ajouter : *Voir figure page précédente.*

Page 435, deuxième formule, chiffre supérieur E (B) = 101, au lieu de 110.

Page 437, deuxième ligne, supprimer : *de partie de ....*

Page 437, quinzième ligne, après  $\frac{1}{250}$ , ajouter : *de cent. cube de* (l'échantillon).

Page, 438, tableau III, au bas de la page, première ligne, après 16, 17 au lieu de 16.

Page 438, quatrième colonne de chiffres, dernière ligne, au-dessous des deux ++, lire + au lieu de : —

Page 439, deuxième paragraphe, à : Voici les résultats, ajouter : *tableau III.*

Page 440, avant-dernier paragraphe, dernière ligne, à : résultats suivants, ajouter : *tableau V.*

Page 441, avant-dernière ligne, lire *ou  $y=1$* , au lieu de : *ou  $y=1$ .*

Page 444, premier tableau, sixième colonne horizontale, troisième colonne de chiffres, lire : 68, 52, 54 au lieu de 33, 49, 47.

Page 447, tableau XV, troisième colonne de chiffres, lire  $\frac{1}{25,5}$  au lieu de  $\frac{1}{22,5}$ .

Page 449, deuxième paragraphe, septième ligne, après : sont les nombres, ajouter *de division* (de *L+*).

Page 449, deuxième paragraphe, huitième ligne, lire *du poison* au lieu de : *de poison.*

Page 450, dans la colonne de QL', dixième chiffre, lire 65,0 au lieu de 6,05.

(1) A propos de ces Errata, et pour éviter des corrections très onéreuses, le Comité de Direction des *Annales* prie les auteurs de vérifier avec soin le texte de leurs mémoires.

---

Le Gérant : G. MASSON.





